



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA
BIOLOGIA

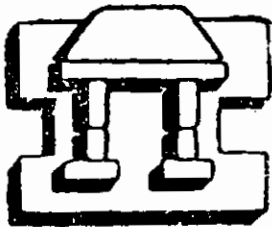
**“Anemia aplástica: modelo para su inducción con
benceno por vía subcutánea en rata y ratón.”**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :

Antonio Muñoz Torres

297407

Directores de Tesis: M. C. Eduardo Barrera Escorcia
M. en C. Rodolfo Velasco Lezama



IZTACALA

Los Reyes Iztacala, Edo. de México

2001



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS.

En primer lugar a mis padres Carmen y Arnulfo quienes decidieron ejercer el privilegio de la creación de una nueva vida y educaron a sus hijos en la responsabilidad, el respeto, la solidaridad y el amor.

A mis hermanos Paco y la Nena quienes siempre han sido un ejemplo de fraternidad y solidaridad (especialmente en los momentos difíciles), así mismo a Miguel y Alejandra quienes decidieron compartir con ellos el desafío de formar una familia en compañía de Maryté, Montserrath, Melisa y Rubén.

A mis compadres Mauricio y Arely quienes han constituido un gran apoyo y punto de referencia mostrándome el verdadero sentido de la amistad.

A todos mis compañeros de la generación...en especial a mis grandes amigos Omar, Héctor, Nacho, Beto, Daniel y Natalia, Jorge y Salomón...por aquellos momentos de diversión y sano esparcimiento.

A los profesores que de la Carrera de Biología de la FES Iztacala que con su ejemplo y enseñanzas contribuyeron a la formación de un profesionista; en especial a: el Dr. José Efraín Garrido Guerrero y la Dra. Rosa Olivia Cañizares Molina, quienes me mostraron el camino de la excelencia universitaria.

A la plantilla de profesores de la materia de Metodología Científica: La Dra. Bertha Segura Alegria, el Dr. Martín Palomar Morales, El M. en C. Gabriel Camarena Gutiérrez y la M. en C. Margarita Canales Martínez, quienes generosamente me han brindado su apoyo incondicional y compartido su experiencia profesional.

A aquellos (as) estudiantes de la carrera de Biología que han motivado mi desarrollo y mejor desempeño como profesionista...Georgina Arteaga Illán, Elena Cristina González Castillo; Mayela Chaidez García y Claudio Noriega Melgoza...por mostrar un gran interés y alegría por la vida y el conocimiento.

Al M. en C. Víctor Ramón Moreno Torres quien desinteresadamente ha fomentado con su valiosa experiencia y consejos mi desarrollo personal y profesional.

A la Biol. Daleth, quien con sus consejos, paciencia, comprensión y orientación, encaminó los pasos de un futuro biólogo.

Y Finalmente a Verónica quien además de su paciencia, ternura, comprensión y apoyo durante todo este tiempo, ha significado un gran aliciente para enfrentar la vida y continuar con alegría y optimismo. Gracias Bodoque.

Agradezco de manera especial a:

Dr. Eduardo Barrera Escorcía quien además de aceptar dirigir el presente trabajo, generosamente me ha brindado en el transcurso de estos años el apoyo incondicional y necesario para la realización de esta tesis de licenciatura, así como la orientación adecuada para mi formación como universitario y persona.

Dr. Rodolfo Velasco Lezama, quien en los últimos años, además de dirigir el presente trabajo, ha compartido gran parte de su tiempo, conocimientos y experiencia profesional para la realización de esta tesis de licenciatura, además de constituir en todo momento un ejemplo de perseverancia, entusiasmo y profesionalismo académico.

Dr. Mario García Lorenzana del Dpto. de Biología de la reproducción de UAM Iztapala, quien brindó las facilidades para el procesamiento e interpretación de la histopatología realizada en este proyecto de tesis de licenciatura.

A los Revisores: Dr. Rafael Jiménez Flores, al M. en C. Agustín Ruíz Cabrera, la Biol. Carmen Álvarez Jiménez y la Biol. Josefina Vázquez Medrano, por su apoyo, valiosas observaciones y sugerencias, para la realización del presente trabajo.

A todas aquellas personas con quienes he convivido en el laboratorio de Biorregulación: Martha, Irma y José, Alonso, Betzabeth y Manolo, que han hecho placentera mi estancia durante todo este tiempo.

Con frecuencia la ignorancia engendra mas confianza que el conocimiento; son los que saben poco, y no los que saben mucho, los que aseveran positivamente que este o aquel problema nunca será resuelto por la ciencia.

Charles Darwin (1809 – 1882).

Nunca tomen al estudio como un deber si no como la envidiable oportunidad de aprender.

Albert Einstein (1869 – 1955)

Nuestra ciencia confrontada con la realidad, es primitiva e infantil. Y sin embargo, es lo mas valioso que tenemos.

Albert Einstein (1869 – 1955).

No podemos decir que los humanistas, escritores o artistas del presente sean mejores que los del pasado. En cambio, la ciencia actual es mejor que la pretérita y la del futuro será mejor que la del presente.

Guillermo Haro.

ÍNDICE

Página

Resumen	1
Introducción	2
Metabolismo del benceno	3
Hematopoyesis	7
Factores hematopoyéticos de crecimiento	13
Regulación de la hematopoyesis	15
Células linfoides	17
Linfocitos B	18
Linfocitos T	19
Células asesinas naturales	21
Células mieloides	22
Polimorfonucleares (neutrófilos)	22
Mononucleares (monocitos/macrófagos)	23
Células dendríticas	26
Eosinófilos	29
Basófilos y mastocitos	29
Plaquetas	301
Eritrocitos	31
Anemia Aplástica	32
Patogénia	34
Diagnóstico	37
Pronóstico	44
Tratamiento	42
Identificación, evaluación y eliminación de los agentes etiológicos	42
Terapia de soporte	42
Restauración de la hematopoyesis normal	43
Andrógenos	43
Glucocorticoides	43
Litio	43
Inmunosupresión	43

ÍNDICE

	Página
Reguladores hematopoyéticos de acción positiva	43
Transplante de médula ósea	43
Transplante singénico de médula ósea	44
Transplante alogénico de médula ósea	44
Transplante alogénico sin alta similitud de HLA	44
Pruebas de histocompatibilidad	44
Régimen de acondicionamiento pretransplante	46
Consideraciones postransplante	46
Complicaciones	47
Transplante autólogo de médula ósea	49
Transplante de células hemocoriales	49
Inducción experimental de anemia aplásica en animales de laboratorio	51
Hipótesis	57
Objetivos	57
Diseño experimental	58
Material y Métodos	62
Resultados	67
Discusión	94
Conclusiones	102
Referencias bibliográficas	103
Apéndice (técnicas)	112

ÍNDICE DE FIGURAS.

	Página
Figura 1. Modelo fisiológico para las vías de absorción, distribución a los tejidos y metabolismo del benceno en roedores.	3
Figura 2. Esquema del metabolismo del benceno.	5
Figura 3. Esquema del metabolismo y eliminación del benceno.	6
Figura 4. Ontogenia de la hematopoyesis en el humano	8
Figura 5. Esquema de la hematopoyesis normal en humanos.	10
Figura 6. Esquema de los linajes celulares a partir de la célula stem	11
Figura 7. Microfotografía con microscopio electrónico de barrido en donde se representa la distribución celular en la maduración de las células sanguíneas.	12
Figura 8. Papel de diversas citocinas en el proceso de formación de las células sanguíneas (hematopoyesis)	14
Figura 9. Reconocimiento y eliminación de células propias tumorales o no funcionales	17
Figura 10. Tipos celulares en sangre periférica	31
Figura 11. Extendido de médula ósea de un paciente sano.	33
Figura 12. Extendido de médula ósea de un paciente con anemia aplásica.	33
Figura 13. Esquema simplificado del complejo principal de histocompatibilidad en humano.	45
Figura 14. Molécula clase II del complejo principal de histocompatibilidad	46
Figura 15. Cortes histológicos de bazo de ratas control; tratadas con benceno y con aceite de maíz respectivamente. Esquema 1a.	79
Figura 16. Cortes histológicos de bazo de ratas control; tratadas con benceno y con aceite de maíz respectivamente. Esquema 2a.	80
Figura 17. Cortes histológicos de bazo de ratones control; tratados con benceno y con aceite de maíz respectivamente. Esquema 2a.	92
Figura 18. Cortes histológicos de bazo de ratones control; tratados con benceno y con aceite de maíz respectivamente. Esquema 2ª.	93

ÍNDICE DE TABLAS.

Página

Tabla 1. Criterios para definir los casos de anemia aplásica severa, según el Grupo Internacional de Estudio de la Anemia Aplásica.	32
Tabla 2. Efectos de la administración de benceno por vía inhalatoria en rata.	51
Tabla 3. Efectos de la administración de benceno por vía inhalatoria en ratón.	52
Tabla 4. Efectos de la administración de benceno por vía subcutánea y oral en rata.	53
Tabla 5. Efectos de la administración de benceno por vía subcutánea y oral en ratón.	54
Tabla 6. Parámetros usualmente evaluados en modelos de simulación fisiológica para el metabolismo del benceno en rata y ratón.	55
Tabla 7. Inducción experimental de anemia aplásica en rata (esquemas 1a y 1b). Peso corporal y esplénico	72
Tabla 8. Inducción experimental de anemia aplásica en rata (esquemas 1a y 1b). Parámetros eritroides	73
Tabla 9. Inducción experimental de anemia aplásica en ratón (esquemas 2a y 2b). Peso corporal y esplénico.	84
Tabla 10. Inducción experimental de anemia aplásica en ratón (esquemas 2a y 2b). Parámetros eritroides.	85

ÍNDICE DE GRÁFICAS.

Gráfica 1. Concentración de eritrocitos en sangre periférica de rata (esquemas 1a y 1b).	74
Gráfica 2. Concentración de plaquetas en sangre periférica de rata (esquemas 1a y 1b).	74
Gráfica 3. Concentración de leucocitos en sangre periférica de rata (esquemas 1a y 1b).	75
Gráfica 4. Cuenta diferencial de leucocitos en sangre periférica de rata (Grupo Ben 1a esquema 1a).	76
Gráfica 5. Cuenta diferencial de leucocitos en sangre periférica de rata (Grupo Ben 1b esquema 1b).	77
Gráfica 6. Concentración de células nucleadas totales de la médula ósea de rata (esquemas 1a y 1b).	78
Gráfica 7. Concentración de eritrocitos en sangre periférica de ratón (esquemas 2a y 2b).	87
Gráfica 8. Concentración de plaquetas en sangre periférica de rata (esquemas 2a y 2b).	87
Gráfica 9. Concentración de leucocitos en sangre periférica de rata (esquemas 2a y 2b).	88
Gráfica 10. Cuenta diferencial de leucocitos en sangre periférica de ratón (Grupo Ben 2a esquema 2a).	89
Gráfica 11. Cuenta diferencial de leucocitos en sangre periférica de ratón (Grupo Ben 2b esquema 2a).	90
Gráfica 12. Concentración de células nucleadas totales de la médula ósea de ratón (esquemas 2a y 2b).	91

ABREVIATURAS.

AA:	Aplásic Anemia.
ADN:	Ácido Desoxiribonucleico.
ARN:	Ácido Ribonucleico.
MO:	Médula Ósea.
IL:	Interleucina.
CFU:	Colony Forming Units (Unidades Formadoras de Colonias).
TMO:	Transplante de Médula Ósea.
CFA:	Ciclofósfamida.
GAL:	Globulina Anti Linfocitaria.
GAT:	Globulina Anti Tímocito
CSF:	Colony Stimulating Factor (Factor Estimulante de Colonias).
GM-CSF:	Granulocyte Macrophages Colony Stimulating Factor. (Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos Macrófagos).
M-CSF:	Macrophage Colony Stimulating Factor. (Factor Estimulante de Colonias de Mielocitos.
EPO:	Eritropoyetina.
HLA:	Human Leucocyte Antigens. Antígenos Leucocitarios Humanos.
MHC:	Major Histocompatibility Complex. (Complejo Mayor de Histocompatibilidad).
Cys A:	Ciclosporina A.
Ag:	Antígeno.
BCR:	B Cell Receptor (Receptor de la Célula B).
Abs:	Antybodies (Anticuerpos).
RE:	Retículo Endoplásmico.
TCR:	T Cell Receptor (Receptor de la Célula T).
APC:	Antigen Presenting Cell (Célula Presentadora de Antígeno).
CTL:	Citotoxic T Lymphocytes (linfocitos T Citotóxicos)
Rer:	Retículo Endoplásmico rugoso.
NK:	Natural Killers (Células Asesinas Naturales).
CD:	Cluster of Differentiation (Marcador de Superficie).
Mlg:	Membrane Immunoglobulins (Inmunoglobulinas de membrana)
ADCC:	Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity (Citotoxicidad Celular Dependiente de Antígeno).
ROI:	Reactive Oxygen Intermediates (Intermediarios de Oxígeno Reactivo).
RNI:	Reactive Nitrogen Intermediates (Intermediarios de Nitrógeno Reactivo).
ECF-A	Eosinophil Chemotactic Factor-A (Factor-A Quimiotáctico de Eosinófilos).
GVHD:	Graft Versus Host Disease (Enfermedad de Injerto Contra el Huesped)

RESUMEN.

El benceno es uno de los agentes químicos utilizados con mayor frecuencia. Se encuentra como uno de los principales contaminantes en el ambiente como resultado de la producción, manejo, transporte y combustión de la gasolina. La vía de exposición al benceno más frecuente en el hombre es la inhalación, aunque también puede ocurrir la absorción cutánea y en menor proporción por vía oral. El benceno se ha asociado con el desarrollo de una amplia gama de trastornos como depresión del sistema nervioso central, hepatotoxicidad, carcinogénesis, alteraciones en sangre periférica, inmunotoxicidad, hematotoxicidad (leucemia, anemia refractaria y anemia aplásica). Para conocer el daño celular causado por el benceno en animales de laboratorio (rata y ratón), se utiliza con más frecuencia la vía de exposición inhalatoria, debido a que es la principal fuente de contacto en el hombre, sin embargo los esquemas de tratamiento empleados difieren mucho entre sí, reportando resultados que hasta el momento no son concluyentes. Por tal motivo el objetivo del presente trabajo fue: **Establecer un modelo reproducible de inducción de anemia aplásica con benceno por vía subcutánea en rata y ratón que permita su utilización en el estudio de los diferentes estadios de este padecimiento.** Se utilizaron dos especies diferentes (rata y ratón) y para cada caso se ensayaron dos esquemas de inducción de anemia aplásica (a y b) mediante la administración subcutánea de benceno respectivamente. Se emplearon 150 ratas macho cepa Wistar de 8 semanas de edad. Esquema 1a: 30 ratas fueron distribuidas en 3 grupos con 10 animales cada uno: Control, sin tratamiento (Con1a), Testigo: 2 mL de aceite de maíz/Kg de peso vía subcutánea (Tes1a), Experimental: 2 mL de benceno (J.T. Baker) 50% v/v en aceite de maíz/Kg de peso vía subcutánea (Ben1a). La administración de los tratamientos siguió un esquema de cinco días de aplicación y dos de descanso durante 8 semanas. Esquema 1b: se emplearon 120 ratas distribuidas en cuatro lotes de treinta animales cada uno: tratados durante 8 semanas hasta completar 10, 20, 30 y 40 aplicaciones, (siguiendo el mismo esquema que para 1a). Cada lote fue subdividido en tres grupos con 10 animales de la siguiente manera: Control, (Con 1b), Testigo: (Tes 1b), Experimental: (Ben 1b), los que recibieron el tratamiento por la misma vía y en la misma concentración que para el esquema 1a. Por otra parte, se utilizaron 180 ratones macho cepa CD1, de 8 semanas de edad. Esquema 2a: 90 ratones fueron distribuidos en tres lotes de 30 cada uno: Control, (Con 2a), Testigo (Tes 2a); Benceno (Ben 2a). Cada lote fue subdividido en tres grupos de 10 animales, el tratamiento se administró a cada grupo, siguiendo el mismo esquema para la rata, hasta completar 10, 15 y 20 aplicaciones respectivamente. En el segundo esquema se emplearon 90 ratones que fueron distribuidos de la misma manera que para el esquema 2b, se administró el benceno cada tercer día con dos días de descanso hasta completar las 10, 15 y 20 aplicaciones respectivamente. Dos días después del término de los diferentes periodos de inoculación a cada grupo, se evaluó el cuadro clínico, se obtuvo la sangre por punción cardíaca y se realizó biometría hemática completa. La médula ósea fue obtenida para la cuantificación de células nucleadas totales. El bazo fue aislado, para su estudio histopatológico. Con ambos esquemas de inducción de anemia aplásica en rata, la administración de 40 aplicaciones de benceno por vía subcutánea provocó pancitopenia aplásica sostenida en ausencia de alteraciones no hematológicas. En ratón, a pesar de que los dos esquemas de tratamiento con benceno ensayados provocaron un cuadro de anemia aplásica, el esquema (2a) causó efectos colaterales que alteran la manifestación de la anemia aplásica. En el esquema (2b) se logró provocar de manera clara un cuadro característico de anemia aplásica, lográndose además la supervivencia de los animales de experimentación con el menor número de alteraciones no hematológicas. Con este trabajo se ha logrado establecer un modelo experimental para la inducción de anemia aplásica con benceno en rata y ratón por vía subcutánea, con resultados equiparables a los comunicados para la inhalación de este compuesto, logrando con ello disminuir el tiempo de tratamiento y el empleo de equipo costoso, teniendo mayor control sobre la dosificación, el tiempo de tratamiento y la administración del benceno, así como conocer el comportamiento del cuadro a diferentes tiempos de aplicación. Logrando con este sistema de trabajo dos modelos de bajo costo y fácil reproducción.

INTRODUCCIÓN.

El benceno es uno de los agentes químicos industriales utilizados con mayor frecuencia: como disolvente de pinturas, pegamentos, barnices, agentes desengrasantes y en la producción de pieles artificiales (Goldstein & Wits. 1992). Por su alta capacidad de vaporización, se encuentra como uno de los principales contaminantes constantes en el ambiente como resultado de la producción, manejo, transporte y combustión de la gasolina (IPCS 1993).

En la atmósfera, el benceno presenta una permanencia variable, desde unas pocas horas hasta días dependiendo de las condiciones climáticas y de la concentración de radicales hidroxilos, nitrógeno y dióxido de azufre atmosféricos. Los niveles ambientales del benceno en áreas rurales van de 2 a 349 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (0.0006 - 0.1082 ppm), en contraste en centros industriales y urbes se han medido niveles por encima de 10 000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (3.1 ppm). Puede ser removido de la atmósfera gracias a la precipitación fluvial, ocasionando contaminación de las aguas superficiales continentales (IPCS 1993).

En espacios cerrados, como en casas o departamentos, la presencia de benceno puede atribuirse entre otras causas al humo de cigarro, a la evaporación de solventes, limpiadores de alfombras, detergentes líquidos, grasas y ceras utilizadas para limpiar o restaurar muebles (Warner 1993); por ejemplo, en estados Unidos de Norte América, se han llegado a monitorear niveles de hasta 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (0.155 ppm).

La vía de exposición al benceno más frecuente en el hombre es la inhalación, aunque también puede ocurrir por absorción cutánea y en menor proporción por vía oral mediante la ingestión de carne irradiada o enlatada y tratada con calor (IARC 1982); así como por el consumo de productos del mar presentes en aguas contaminadas con petróleo o gasolinas. Se calcula que la exposición diaria por consumo de alimento e ingesta de agua contaminados es mínima, de: 5-24 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso (Ferrairo *et al.* 1985).

El benceno es metabolizado principalmente en el hígado, mediado por el sistema enzimático de la citocromo P-450 IIEI asa, dando lugar a una gran variedad de productos

hidroxilados y de cadena abierta que son transportados hacia la médula ósea donde ocurre un metabolismo secundario (Figuras 1 y 2).

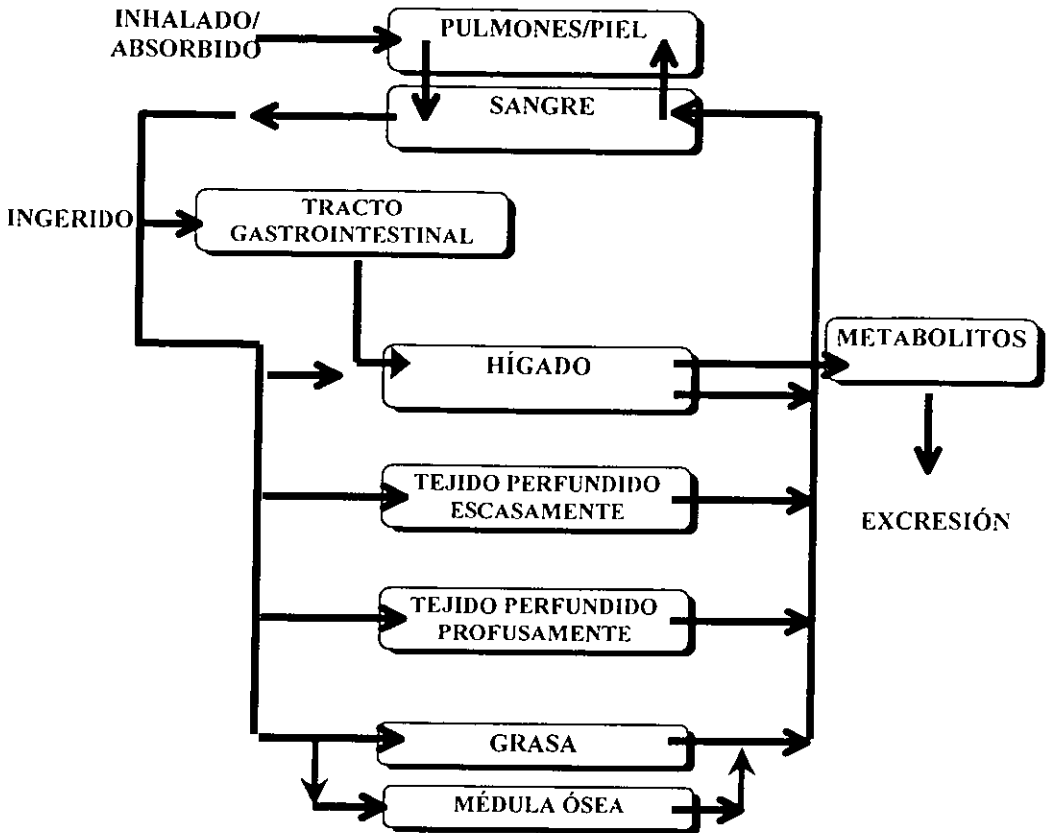


Figura 1. Modelo fisiológico propuesto por Ramsey & Andersen (1984) para las vías de absorción, distribución a los tejidos y metabolismo del benceno en roedores.

Metabolismo del benceno.

Las formas posibles por las que los metabolitos del benceno pueden inducir toxicidad son: las uniones covalentes de los metabolitos reactivos de este solvente a las membranas celulares y la capacidad de los mismos para inducir alteraciones oxidativas (Snyder *et al* 1978; Snyder *et al* 1980).

El metabolismo del benceno puede seguir diferentes vías para su modificación y posterior eliminación:

1.- El fenol es el primer metabolito formado por la oxidación del benceno, seguido de la conjugación de este a fenil-sulfato y fenil-glucurónido.

2.- Una segunda vía para la oxidación del benceno consiste en la reacción con glutatión y una modificación subsecuente de los ácidos mercaptúricos, esta vía está representada por la combinación de la concentración total de los ácidos: prefenil-mercaptúrico y fenil-mercaptúrico.

3.- La tercera vía para el metabolismo del benceno involucra reacción del benceno oxidado hacia fenol, oxidación a hidroquinona y conjugación de glucurónido o sulfato de hidroquinona, para esta vía las concentraciones totales de hidroquinona-glucurónido y sulfato de hidroquinona se combinan.

4.- La cuarta vía es la conversión del benceno oxidado a ácido mucónico posiblemente a través de un intermediario como el muconaldehído. Aunque el benceno puede dar origen a otros metabolitos como el catecol o el trihidroxibenceno, estos se encuentran en muy bajas concentraciones, por lo que las vías de formación de dichos metabolitos son poco estudiadas (Medinsky *et al.* 1978; Medinsky *et al.* 1989). Se asume que el metabolismo de este solvente se lleva a cabo en el hígado. Las vías para el metabolismo del benceno se muestran en la figura 2.

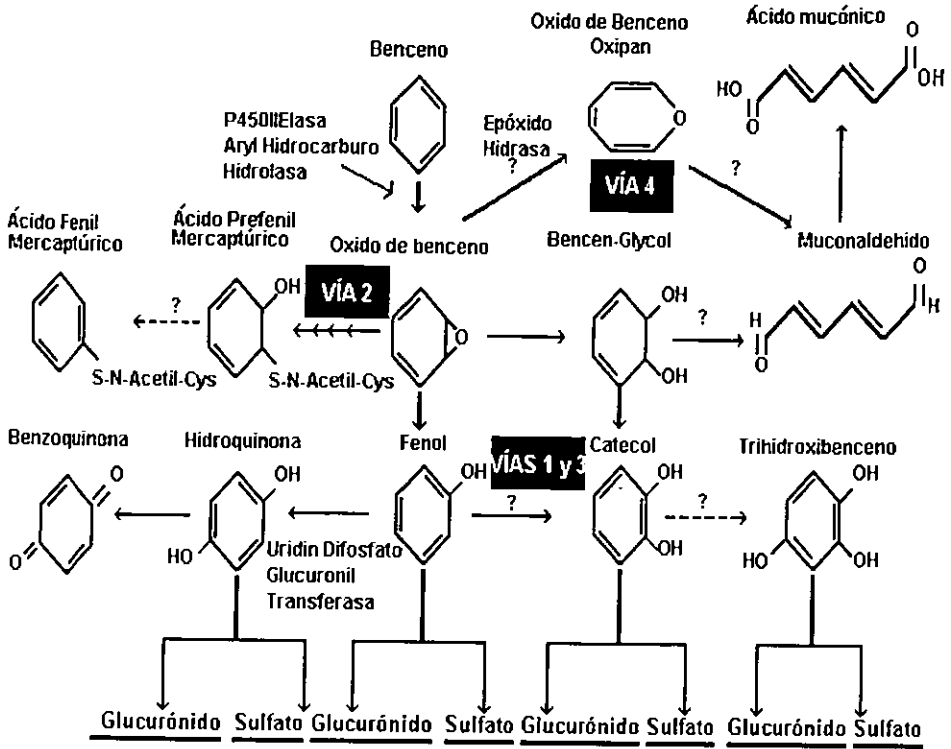


Figura 2. Esquema del metabolismo del benceno. Modificado por Huff et al. 1983.

Basados en los hallazgos experimentales, se sabe que la eliminación del benceno y sus metabolitos es la siguiente: aproximadamente el 40% sale del organismo por medio del intercambio de gases en la respiración; el restante es oxidado y eliminado principalmente como fenol (25 – 50 %) y sus derivados (fenilglucurónido 5 % y fenil sulfato 50 %), seguido del bencil glicol (0.3 %), los ácidos trans – trans mucónico y fenil mercaptúrico (0.5 %), hidroquinona e hidroxiquinona (5 y 3% respectivamente) figura 3.

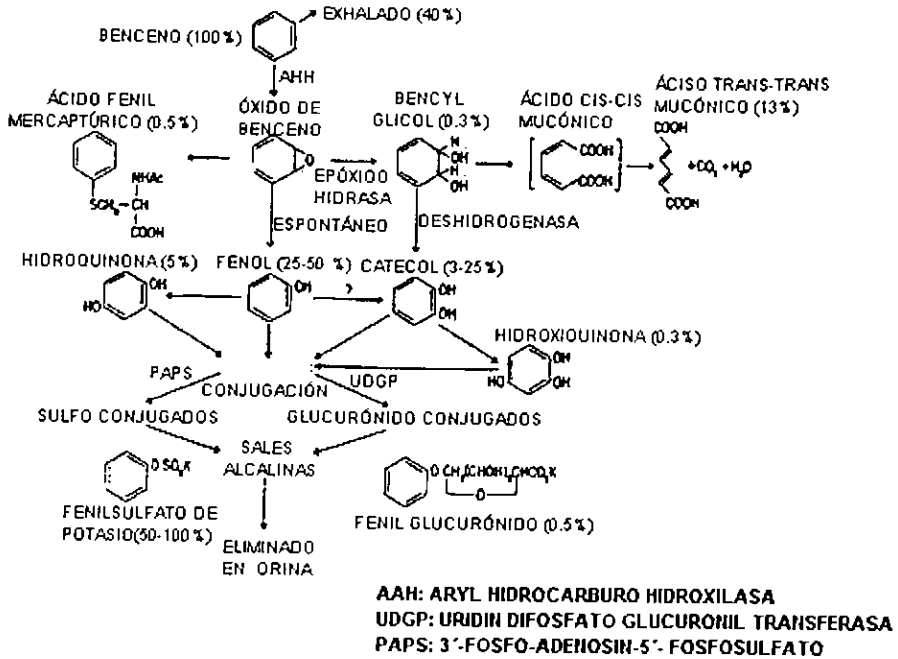


Figura 3. Esquema del metabolismo y eliminación del benceno. Modificado por Huff et al. 1983.

Debido a su presencia constante en el ambiente y la industria, el benceno se ha asociado con el desarrollo de una amplia gama de trastornos, como depresión del sistema nervioso central, irritación cutánea, hepatotoxicidad, carcinogénesis mielotoxicidad, alteraciones en sangre periférica e inmunotoxicidad por depresión de la proliferación de linfocitos B y T entre otros (Ross et al. 1996; Hillman et al. 1977; Irons et al. 1979; Woo et al. 1989; Henderson 1996). Se ha encontrado que el benceno es capaz de unirse al ADN formando aductos de desoxiguanosina y desoxiadena en las células mieloides de roedores (IARC1982).

En estudios realizados por Yin y colaboradores (1987) se evaluaron los daños hematológicos en trabajadores expuestos al benceno durante el periodo de 1972 a 1987; en estos estudios se diagnosticaron 42 casos de leucemia, 17 linfoma no Hodgkin y otros síndromes mielodisplásicos, se observó que las enfermedades se presentaron en igual

proporción entre hombres y mujeres y se demostró que el desarrollo de la enfermedad se asocia con la exposición acumulativa de benceno.

Linnet y colaboradores en 1986, reportaron que los trabajadores expuestos a este solvente presentaron una tasa más alta de mutaciones somáticas y varias clases de aberraciones cromosómicas en linfocitos periféricos.

Los efectos más significativos de la exposición al benceno son hematotoxicidad, inmunotoxicidad y carcinogenicidad; por lo que tradicionalmente se ha reconocido que varios tipos de discrasias sanguíneas, entre las que se incluye a la anemia, trombocitopenia, granulocitopenia, linfocitopenia, pancitopenia, leucemia anemia refractaria y anemia aplásica, son el resultado de la exposición al benceno y constituyen diferentes estados de intoxicación; tales cambios o alteraciones deben ser reconocidos como procesos dinámicos y no como entidades estáticas y discretas. El efecto del benceno sobre el sistema inmunológico y hematopoyético está en relación directa al tiempo y dosis, notándose un efecto dosis-respuesta (IPCS 1993). Lo que podría extrapolarse a lo observado en pacientes en los que el desarrollo de anemia, granulocitopenia y linfocitopenia (leucopenia), trombocitopenia, representan la etapa inicial de enfermedades hematológicas de pronóstico fatal como leucemia, síndromes mielodisplásicos y anemia aplásica (AA).

Hematopoyesis.

La hematopoyesis es el proceso mediante por medio del que se lleva a cabo la formación y desarrollo de las diferentes células sanguíneas a partir de la célula madre pluripotencial (*stem*).

Durante las primeras semanas del desarrollo embrionario, las células stem, se encuentran en el saco vitelino, las cuales comienzan a diferenciarse en células eritroides, provistas de hemoglobina embrionaria. Desde el tercer hasta el séptimo mes de gestación, las células stem migran en primer lugar hacia el hígado fetal, y posteriormente al bazo fetal, donde continúa el proceso de hematopoyesis. A partir del séptimo mes, la hematopoyesis en el hígado y bazo, disminuye gradualmente hasta el nacimiento; en ese

momento, el papel de la médula ósea como principal órgano hematopoyético, adquiere preeminencia (figura 4).

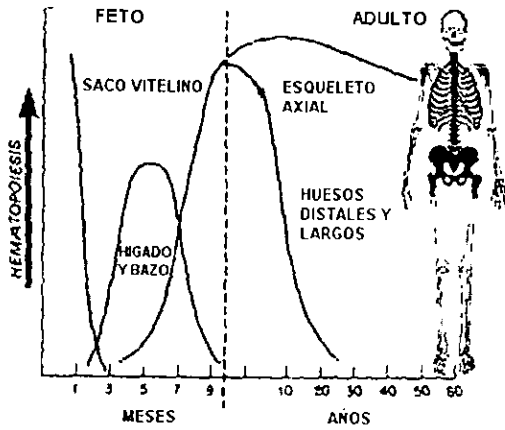


Figura 4. Ontogenia de la hematopoyesis en el humano. Fuente Hammening 1990.

Todas las células sanguíneas proceden de la mencionada célula stem. En la médula ósea, la proporción entre la célula stem y las demás células es de 1: 10000. La célula presenta la capacidad de autorregeneración, de modo que durante la vida adulta se mantiene homeostáticamente; en circunstancias de alta demanda de células sanguíneas aumenta su capacidad proliferativa (figura 5).

HEMATOPOYESIS

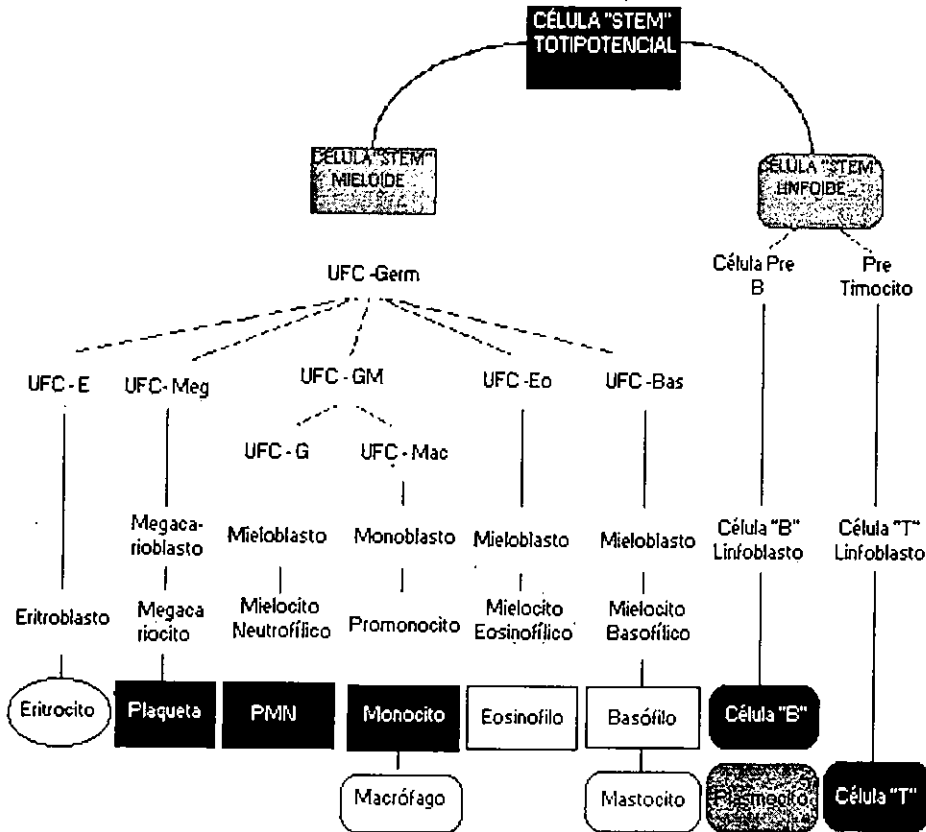


Figura 5. Esquema de la hematopoyesis normal en humanos. Clave: UFM-Germ: Unidad Germinal Formadora de Colonias, UFC-E: Unidad Formadora de Colonias de de eritrocitos, UFC Unidad Formadora de colonias de: Megacariocitos (Meg), Granulocitos Macrófagos (GM), Basófilos (Bas), Eosinófilos (Eo), Granulocitos (G), Macrófagos (Mac), Eritrocitos (E); PMN: Polimorfonucleares. Fuente: Powers, P. 1995. Hematopathology. Cornell University Medical College.

A partir de la célula stem, se originan dos linajes principales: el linaje linfoide y el mieloide, a este nivel, los progenitores celulares quedan "comprometidos" o restringidos a seguir una determinada ruta de diferenciación; en el caso del linaje linfoide, exclusivamente se producirán linfocitos, mientras que el linaje mieloide, dará origen a eritrocitos, plaquetas, basófilos, eosinófilos, neutrófilos y macrófagos respectivamente; ello se debe a que ambos linajes adquieren la capacidad de responder a determinadas señales (citocinas), figura 6.

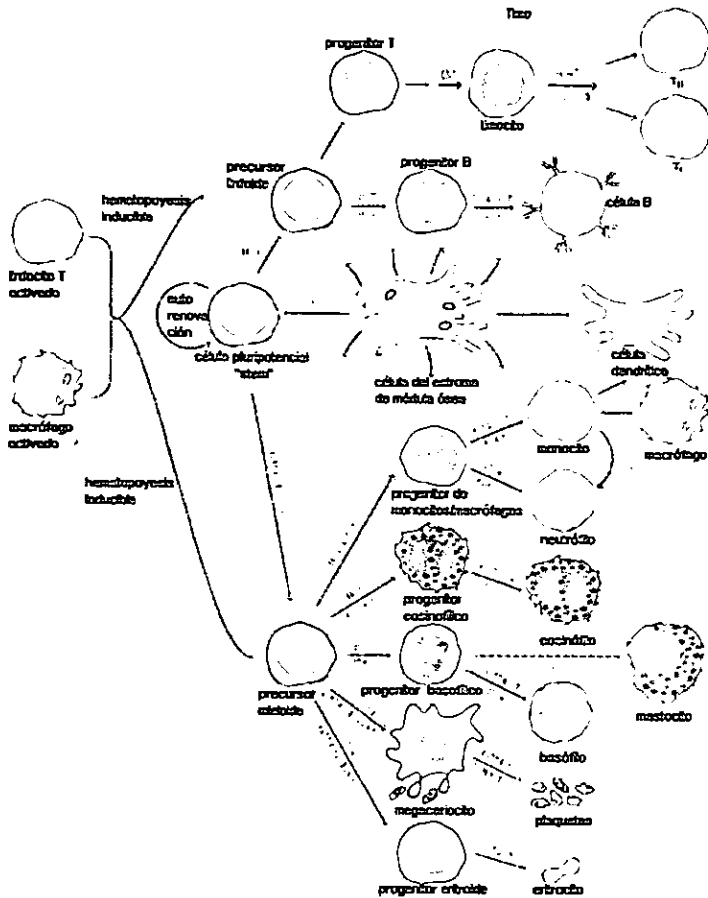


Figura 6. Esquema de la hematopoyesis normal en humanos, en donde los diferentes precursores sanguíneos en presencia de las citocinas específicas quedan comprometidos con una estirpe celular. Fuente: David C. Dale 1998. En Scientific American: Medicina capítulo 14, 1998.

En la médula ósea adulta, las células hematopoyéticas van madurando y diferenciándose en el interior de un estroma compuesto por células no hematopoyéticas (osteoblastos, osteoclasto, células grasas, células endoteliales endoteliales, fibroblastos, etc.). La maduración se debe al microambiente suministrado por la matriz celular del estroma junto con factores solubles principalmente. Entre ellos se encuentran diversos factores de crecimiento. Las células ya diferenciadas pasan a través de la pared

sinusoidal, a los senos de la médula ósea, desde donde acceden a la circulación periférica (figura 7).

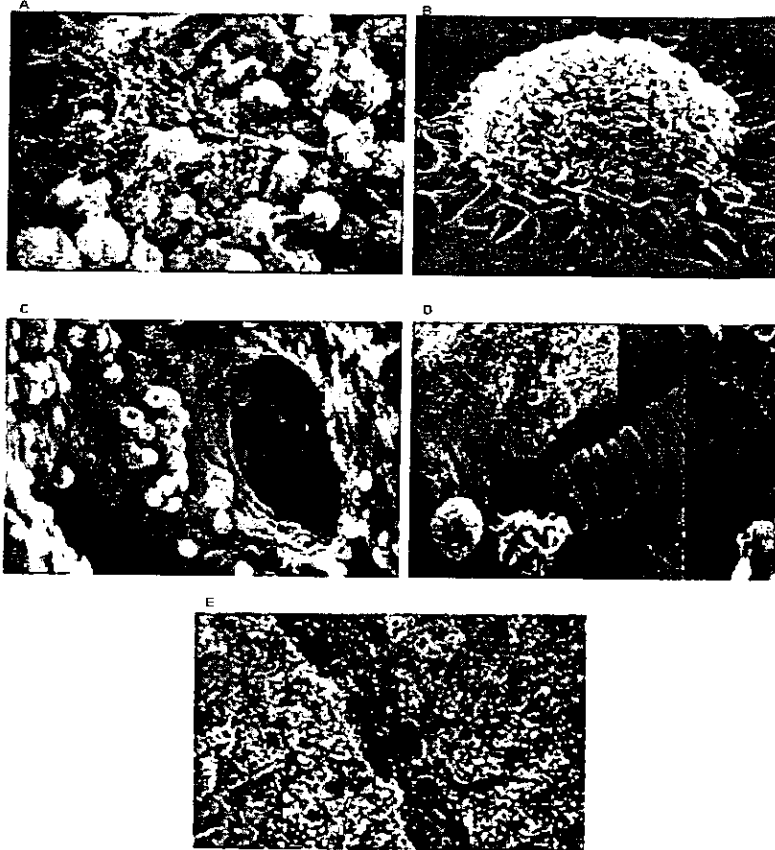


Figura 7. Microfotografía con microscopio electrónico de barrido en donde se representa la distribución celular en la maduración de las células sanguíneas. A) células mieloides maduras en la médula ósea; B) célula tallo totipotencial "stem"; C) y D) A mayor aumento, sinusoide mostrando la salida de eritrocitos y granulocitos hacia la circulación; E) Corte a través de la médula ósea, se observa sinusoide central y conexiones. Fuente : Neupogen: Monografía del producto. F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basilea, Suiza. I. MED. SGE – 1839/J.

Factores hematopoyéticos de crecimiento

Las células hematopoyéticas requieren factores de crecimiento para garantizar la supervivencia y llevar a cabo los procesos de multiplicación, diferenciación y maduración.

Existen varios tipos de factores:

1. Factores estimuladores de formación de colonias (CSF), pertenecientes a la familia de las glucoproteínas ácidas. Entre los que encontramos a: la interleucina 3 (IL-3) o factor de estimulación de colonias múltiples, es un factor multilínea; GM-CSF (estimulador de la línea granulocito-macrófago); M-CSF (de la línea que conduce al monocito-macrófago); G-CSF (de la línea que desemboca en los granulocitos).
2. Eritropoyetina (EPO), que se produce en el riñón e hígado, y que estimula el crecimiento y diferenciación de los progenitores eritroides para dar origen a los eritrocitos.
3. Otros factores: principalmente las interleucinas IL-3 que es producida por los linfocitos T, los queratinocitos y mastocitos, y estimula la producción y diferenciación de macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, megacariocitos y eritrocitos; la IL-6 que es producida por las células del estroma medular, linfocitos T y macrófagos, activa a los progenitores hematopoyéticos y células en la fase G_0 , induce la maduración de megacariocitos, induce el crecimiento y/o diferenciación de los linfocitos T y linfocito B; la IL-9 que es secretada por los linfocitos T, su función es ayudar al soporte de la producción de eritrocitos (colaborando con la eritropoyetina) por las unidades formadoras de colonias eritroides en la médula ósea segregadas por células del estroma medular, macrófagos activados, etc (Figura 8).

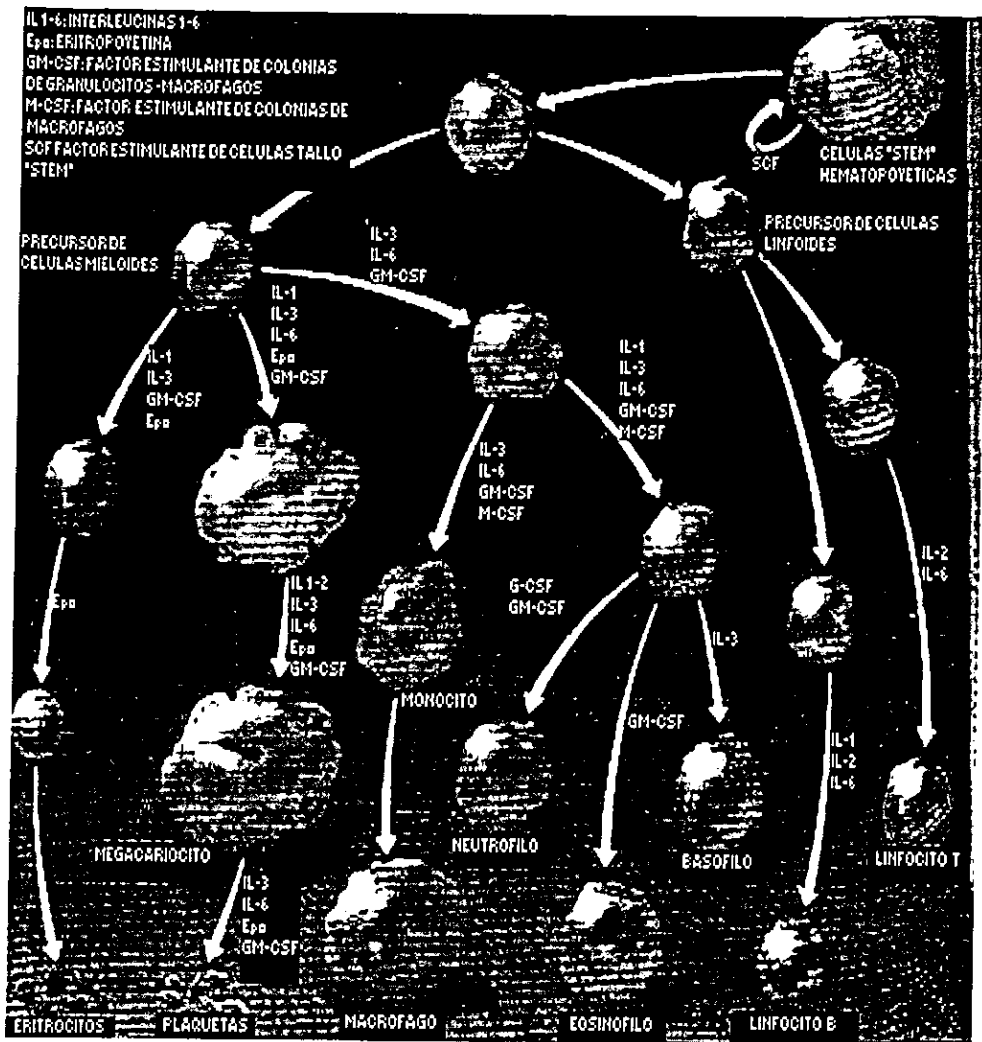


Figura 8. En el proceso de formación de las células sanguíneas (hematopoyesis), intervienen diversas citocinas (Interleucinas ILs) y factores de crecimiento (SCF, GM-CSF, M-CSF, Epo,) que tienen un efecto directo sobre la célula tallo totipotencial "stem" para su duplicación y diferenciación para dar origen a las diferentes poblaciones celulares presentes en sangre periférica. Fuente: Hiromitsu Nakauchi et Gabriel Gachelin. 1993. Les Cellules Souches du Sang. La Recherche (spécial: Le Sang). 254 Mai. Volume 24. Page 537 – 541.

Regulación de la hematopoyesis.

La hematopoyesis se mantiene durante toda la vida del individuo, de modo que el número de células nuevas equilibra al de células que se pierden o mueren. Cada tipo celular tiene una vida media más o menos característica: los eritrocitos viven alrededor de 120 días, al cabo de los cuales son fagocitados por los macrófagos del bazo, los neutrófilos tienen una vida media de unos pocos días y algunos linfocitos T pueden durar más de 30 años.

En el cuerpo humano se producen aproximadamente unos 400 000 millones de células de la línea hematopoyética cada día.

La hematopoyesis está regulada de forma muy fina, de modo que cada tipo celular tiene un control diferente, pero además, esta regulación es lo suficientemente flexible para permitir incrementos específicos de 10 o 20 veces ante una proceso infecciosos o una hemorragia. La regulación de fase estacionaria (en ausencia de infección o de hemorragia) se logra por la producción y liberación controlada de citocinas principalmente por parte de las células del estroma de la médula ósea. Ante una infección o hemorragia se produce una hematopoyesis inducible (incrementada), por la acción de citocinas segregadas por macrófagos y linfocitos T_H (cooperadores): se incrementa la cantidad de células específicas de la médula ósea, que al madurar tenderán a migrar al foco de infección o lesión.

Muerte celular programada.

En cada linaje hematopoyético existe un equilibrio entre la producción de nuevas células y la destrucción de células adultas. Esta destrucción ocurre por la llamada muerte celular programada o apoptosis, en la que los eventos principales observados por microscopía son:

1. La célula disminuye de tamaño (se encoge); se modifica su citoesqueleto, lo cual se refleja en que la membrana celular se arruga.
2. La cromatina se condensa en varias zonas del núcleo (fenómeno de picnosis).
3. El ADN se fragmenta en múltiplos de unos 200 pb, el equivalente al que existe en cada nucleosoma, debido a la acción de nucleasas, que cortan por la región

internucleosómica (ello se ve bien por el patrón "en escalera" del ADN sometido a electroforesis en gel de agarosa).

4. Los núcleos se fragmentan.
5. Al final, la célula se descompone en varios trozos, los llamados cuerpos apoptóticos, que rodeados de membrana, pueden contener orgánulos intactos.
6. Los fagocitos profesionales (macrófagos y leucocitos polimorfonucleares) finalmente fagocitan y degradan los cuerpos apoptóticos: de esta forma se logra que el contenido de las células viejas no se libere al exterior, con lo que se evita la respuesta inflamatoria (figura 9).

Este mecanismo de muerte celular programada, a diferencia del fenómeno de la necrosis (por ejemplo, la que se genera por algún daño tisular). Las células no se hinchan ni terminan estallando, ni liberando sus contenidos al exterior, con lo que no se producen efectos citotóxicos en otras células y tampoco se desarrolla la inflamación junto con la destrucción de tejido característica en el fenómeno de necrosis.

¿Qué hace que una célula moribunda o un cuerpo apoptótico sea reconocido por los fagocitos para su ingestión y destrucción intracelular? Al parecer, existe una serie de cambios en su superficie de su membrana celular que permiten ese reconocimiento (figura 9).

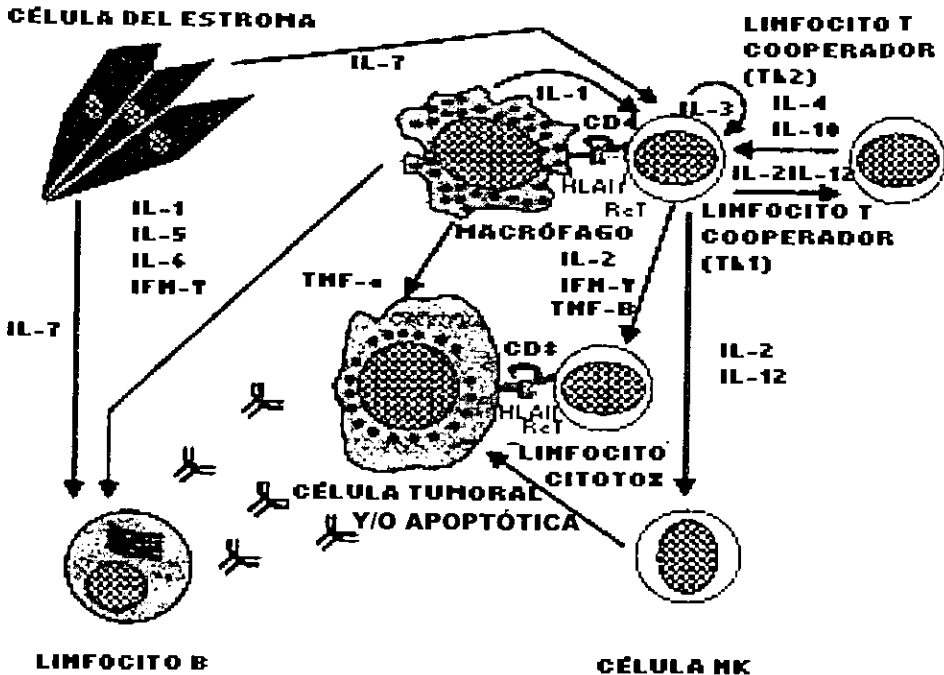


Figura 9. En el reconocimiento y eliminación de células propias tumorales o no funcionales participan diversas poblaciones de linfocitos T (cooperadores), linfocitos B, células asesinas naturales y macrófagos, además de moléculas como citocinas y anticuerpos (inmunoglobulinas), receptores y moléculas accesorias, las cuales pueden tener un efecto directo sobre la célula blanco o bien producir una mayor activación de la respuesta inmune local por medio de las interleucinas (ILs). La alteración de alguno o varios de estos elementos permite que se lleva a cabo una reacción inmune en contra la célula stem (normal), produciendo una inhibición inmunológica de la hematopoyesis. Fuente: Barrera, M. et al. 1995.

CÉLULAS LINFOIDES

Los linfocitos T y B son los responsables de la respuesta inmune específica. Se producen en los órganos linfoides primarios y de allí migran a órganos linfoides secundarios y a espacios tisulares. En el adulto existe un billón de linfocitos, equivalentes a un 2% del peso corporal. Suponen del 20 al 40% de los leucocitos totales. Existen tres

poblaciones de linfocitos funcionalmente distintas, caracterizada cada una por un juego de marcadores, pero son difíciles de reconocer morfológicamente entre sí:

1. células T
2. células B
3. células NK

Los linfocitos T y B vírgenes (no cebados) son pequeños (6 μm de diámetro), con poco citoplasma, que forma un estrecho anillo alrededor del núcleo. Poseen cromosomas condensados, con abundante heterocromatina; albergan pocas mitocondrias, y apenas nada de retículo endoplásmico ni de complejo de Golgi (figura 10).

En sí mismos, en ausencia de un antígeno (Ag) específico, tienen vida corta (de unos días a unas pocas semanas), y fácilmente sufren muerte celular programada.

En cambio, si entran en contacto con el Ag a partir de sus receptores específicos, sales de la fase G_0 y entran en el ciclo celular ($G_0 \rightarrow G_1 \rightarrow S - G_2 - M$). En la fase G_2 corresponden a linfoblastos: aumentan su tamaño (15 μm), aumenta algo la eucromatina, aparece un nucleolo patente y aumenta la proporción del citoplasma bien desarrollado. Estos linfoblastos proliferan y finalmente se diferencian en dos subpoblaciones:

1. Células efectoras, de vida corta, con retículo endoplásmico rugoso bien desarrollado en capas concéntricas.
2. Células de memoria, que están en G_0 , con vida larga (algunas duran toda la vida del individuo).

Linfocitos B.

En los mamíferos, los linfocitos B se diferencian en la médula ósea, mientras que en las aves lo hacen en la *bursa* o bolsa de Fabricio. Constituyen del 5 al 15% de los linfocitos circulantes. Reconocen al antígeno en forma soluble, por medio de sus inmunoglobulinas de membrana (mIg), que forman parte del complejo receptor de las células B (BCR). En cada linfocito hay unas 150.000 moléculas de mIg (de las clases M y D), que han sido sintetizadas por él. Todas estas moléculas poseen la misma especificidad antigénica. Acompañando a cada mIg, unidas no covalentemente con ésta,

existen dos tipos de cadenas acompañantes, llamadas inmunoglobulinas Iga e Igb , que son invariables. Otros marcadores de superficie: receptores para el complemento: CD35 (=CR1) y CD21 (=CR2), receptor para IgG exógena: CD32 (=FcγRII), que juega un papel en las señales negativas para el linfocito B.

En ausencia de estímulo antigénico, estos linfocitos B maduros vírgenes mueren por apoptosis al cabo de unos pocos días. Si, en cambio, se une por su receptor de la célula B (BCR) al Ag complementario específico (y con la ayuda de señales de macrófagos y células T), se pone en marcha la selección y proliferación clonal, que termina (al cabo de 4-5 días) con la diferenciación de dos subpoblaciones: una de células plasmáticas secretoras de anticuerpos (Abs), y otra de células B de memoria (cebadas). Las células plasmáticas poseen las siguientes características:

Carecen de Ig de membrana, son mayores y con más proporción de citoplasma que las B de las que proceden, su retículo endoplásmico (RE) está muy desarrollado, Esto explica la gran cantidad de anticuerpos secretados que producen; esos anticuerpos poseen la misma especificidad antigénica que la de las mlg de la célula B original. No circulan por la sangre ni por los vasos linfáticos, sino que se localizan en los órganos linfoides secundarios y los lugares de la respuesta inmunológica. Viven unos pocos días; al ser células en fase de diferenciación terminal, carecen de capacidad mitótica, y mueren por apoptosis.

Los linfocitos B cebados de memoria, en cambio, pueden vivir en reposo durante largos períodos (más de 20 o 30 años). Cuando se exponen al Ag específico, dan una respuesta inmunitaria más rápida, más intensa, y con mayor afinidad. Su aspecto es similar al de los linfocitos B vírgenes.

Linfocitos T.

Durante la infancia, se diferencian en el timo, pero al llegar la adolescencia, el timo involuciona. Estas células poseen un receptor de membrana (TCR) asociado no covalentemente al llamado complejo CD3, lo que conjuntamente se denomina complejo receptor de las células T. Aunque el TCR es diferente estructuralmente a las Ig, posee zonas homólogas. Una diferencia importante del modo de reconocimiento antigénico del

TCR respecto del BCR es que aquél sólo interacciona con el Ag dispuesto en la superficie de células del propio organismo (de hecho, el antígeno procede de procesamiento proteolítico, y le es "enseñado" al linfocito T asociado a moléculas de MHC).

Los receptores de la célula T están formados por dos cadenas peptídicas con peso molecular de 43 – 49 y 38 – 44 kDa respectivamente. Las dos cadenas tienen un contenido diferente de oligosacáridos. Inicialmente las dos cadenas fueron identificadas como α y β . Posteriormente, cuando el TRC fue estudiado desde el punto de vista ontogénico, se observó que también podían estar formados por otras dos cadenas diferentes a las anteriores, a las que llamaron γ y δ . Esto ha servido para establecer la existencia de dos clases de TCR. Los de clase I poseen cadenas α y β y los de clase II tienen cadenas γ y δ . Los linfocitos T que expresan el TRC $\gamma\delta$ aparecen en el timo antes que los linfocitos T con TCR $\alpha\beta$. La presencia de los primeros se manifiesta como en oleadas, donde cada una de ellas parece estar representada por una familia distinta de linfocitos cuyas cadenas γ y δ aparecen primero en el citoplasma, luego se pueden encontrar tanto en el citoplasma como en la superficie de la membrana y finalmente solo están presentes en la membrana, asociados no covalentemente para formar el TCR. El número de linfocitos con esta clase de receptor en la sangre periférica en el humano es significativamente menor que los que expresan las cadenas $\alpha\beta$. A diferencia de los linfocitos con TCR $\alpha\beta$, una vez que abandonan el timo los linfocitos con TCR $\gamma\delta$ se dirigen selectivamente hacia varios tejidos como la piel, los pulmones, el aparato reproductor y el intestino, en donde se localizan intraepitelialmente, en donde su número es mayor que aquellos linfocitos que expresan el heterodímero $\alpha\beta$ (García 1997). Las células T poseen el TCR de clase II se pueden dividir en dos tipos: Las TCR2 CD4⁺ funcionan como células cooperadoras (T_H): reconocen el Ag expuesto por el MHC-II propio de células presentadoras de Ag (APC), y al hacerlo, se activan y expanden clonalmente, secretando citocinas que juegan un papel clave en la activación de otras células (B, T, etc.). las TCR de clase II CD8⁺ generalmente funcionan como células T citotóxicas (T_c). Reconocen el Ag expuesto en moléculas MHC-I de células propias infectadas con virus o cancerosas, lo cual, junto con las señales adecuadas de citocinas, provoca la activación y proliferación clonal, con diferenciación a linfocitos T citotóxicos (CTL), que matan extracelularmente a las células propias enfermas.

Por supuesto, en cada uno de estos casos de activación, proliferación y diferenciación, se genera paralelamente una subpoblación de linfocitos de memoria.

Durante mucho tiempo se habló de una tercera categoría de linfocitos T, los llamados supresores (Ts), pero su existencia como población diferenciada parece estar descartada.

Células asesinas naturales (NK).

A diferencia de otros linfocitos, carecen de especificidad y de memoria, por lo que forman parte del sistema de inmunidad natural o inespecífico, representan el 15-20% de los linfocitos sanguíneos. Sus marcadores distintivos son CD16 y CD57, pero carecen de marcadores de los linfocitos del sistema específico, su maduración es extratímica; La mayoría (no todos) son linfocitos granulares grandes (LGL), con mayor proporción de citoplasma que los linfocitos T o B. Poseen mitocondrias y ribosomas libres, pero poco retículo endoplásmico rugoso (Rer). Lo que más destaca a microscopio es la existencia de unos gránulos azurófilos densos a los electrones, delimitados por membrana...Poseen dos tipos de funciones: acción citotóxica y acción reguladora del sistema inmune a través de las citocinas que producen (figura 10).

Como células citotóxicas, su papel fisiológico se está empezando a comprender sólo recientemente: existen buenos indicios de que eliminan por inducción de apoptosis a células propias infectadas con virus o células tumorales. Ello lo realizan porque reconocen células propias enfermas en base a que éstas poseen menos moléculas MHC-I, también pueden desarrollar citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

CÉLULAS MIELOIDES.

Las células mieloides son:

Fagocitos: leucocitos polimorfonucleares neutrófilos (PMN) y monocitos, que a su vez se diferencian a macrófagos. Células dendríticas. Eosinófilos. Basófilos. Masocitos (figura 10).

Los fagocitos.

Los granulocitos neutrófilos y los monocitos/macrófagos poseen un origen común. Su antecesor ontogenético es la célula pruripotencial mielo-monocítica (CFU-GM), que se diferencia en dos líneas.

Polimorfonucleares neutrófilos.

Constituyen más del 90% de los granulocitos (polimorfonucleares) Son de vida corta (2-3 días), y se producen en la médula ósea a razón de unos cien mil millones al día, son circulantes, salvo cuando son reclutados a tejidos en inflamación, su núcleo es multilobulado (de 2 a 5 lóbulos), posee gránulos citoplásmicos de dos tipos: los azurófilos (primarios) y los específicos (secundarios). Tras salir de la médula ósea, circulan por la sangre durante 7-10 horas, y luego pasan a tejidos, donde mueren a los 2-3 días. Cuando hay infección, la médula ósea produce más cantidad de neutrófilos (la leucocitosis de neutrófilos es un indicio clínico de infección). Son los primeros fagocitos en llegar a la zona de infección, atraídos por quimiotaxis debida a sustancias liberadas en el foco de la infección, al llegar al foco, actúan como fagocitos: ingieren la partícula extraña, incluyendola en un fagosoma al que se fusionan sus gránulos:

Gránulos azurófilos (primarios): son mayores y más densos, con típica morfología de lisosoma. Contienen mieloperoxidasa y agentes antimicrobianos no oxidantes (defensinas, catepsina G y algo de lisozima).

Gránulos específicos (secundarios): son más pequeños y menos densos a los electrones; contienen la mayor parte de la lisozima de la célula, así como lactoferrina y fosfatasa alcalina.

Ambos tipos de gránulos se fusionan con el fagosoma, para digerir y eliminar la partícula extraña, con mecanismos dependientes de oxígeno más potentes que los del macrófago. Estas células constituyen una buena barrera defensiva frente a bacterias piogénicas.

Fagocitos mononucleares.

El sistema fagocítico mononuclear (SFM) está constituido por los monocitos circulantes y los macrófagos tisulares. Los promonocitos de la médula ósea, al madurar salen de ella, diferenciándose en monocitos circulantes, que al cabo de unas 8 horas emigran a distintos tejidos, donde se convierten en macrófagos.

Monocitos

Son células de unos 10-18 μm de diámetro, con núcleo en forma de herradura o de pera. Su membrana, vista al microscopio electrónico, aparece con finas rugosidades. Su citoplasma posee gránulos azurófilos, que al microscopio electrónico son densos y homogéneos. Dichos gránulos son lisosomas que contienen peroxidasa e hidrolasas ácidas importantes para el mecanismo de muerte intracelular de microorganismos. El aparato de Golgi está bien desarrollado, y se observan mitocondrias.

Macrófagos

Como se ha mencionado, al cabo de unas 8 horas de su salida de la médula, los monocitos migran a tejidos y se diferencian a macrófagos. Los macrófagos pueden ser residentes (fijos en tejidos) o libres.

Residentes: cumplen misiones concretas en cada uno de los tejidos, pudiendo recibir, en su caso, denominaciones peculiares, por ejemplo:

células de Kupffer, en las paredes vasculares de los sinusoides hepáticos

células mesangiales de los glomérulos renales

macrófagos alveolares de los pulmones

macrófagos de las serosas (p. ej., de la cavidad peritoneal)

células de la microglía del cerebro

osteoclastos de los huesos

histiocitos del tejido conjuntivo

Libres: están estratégicamente situados para atrapar material extraño en órganos linfoides secundarios:

macrófagos de los sinusoides esplénicos (en el bazo)

macrófagos de los senos medulares (en los ganglios linfáticos)

Características principales:

Los macrófagos son células de vida más larga que los neutrófilos (meses e incluso años). Poseen un núcleo en herradura, en su citoplasma se ve un abundante retículo endoplásmico rugoso y gran número de mitocondrias. Están especialmente adaptados a luchar contra virus, bacterias y protozoos intracelulares.

Los fagocitos mononucleares constituyen el mejor ejemplo de células que, siendo en principio del sistema inmune. natural, en el curso de la evolución se han adaptado a jugar papeles centrales en el sistema inmune adaptativo:

A) En la respuesta inmune natural: los fagocitos presentan dos tipos de actividades:
como fagocitos.

como productores de citoquinas.

1) Actividad fagocítica:

Los fagocitos engullen (fagocitan) partículas extrañas (microorganismos y macromoléculas extrañas), células propias lesionadas o muertas y restos celulares. El fagocito se ve atraído por quimiotaxis, se adhiere por receptores al microorganismo o partícula extraña, con lo que se activa la membrana del fagocito, emitiendo pseudópodos (basados en el sistema contráctil de actina-miosina), que finalmente se fusionan, cerrándose y creándose una vesícula membranosa que engloba al antígeno, denominada fagosoma.

En la ruta endocítica: el fagosoma se fusiona con los gránulos, para formar el fagolisosoma.

El contenido vertido de los gránulos, junto con otras actividades del macrófago, supone una batería de mecanismos microbicidas y microbiostáticos, además de enzimas hidrolíticas que digieren las macromoléculas. El material de desecho se elimina por exocitosis.

Este sería el mecanismo fagocítico básico (muy similar al ya existente en protozoos amebianos), pero dicho mecanismo primitivo se ve mejorado (unas 4.000 veces) por medio de otros componentes del sistema inmune: se trata de un conjunto de moléculas, denominadas opsoninas, que recubren al microorganismo, y que sirven de vínculo de unión entre la partícula invasora y el fagocito. Como ejemplo de opsoninas se cuentan la IgG (para la que el fagocito posee el receptor Fcγ R) y el componente C3b del complemento (para el que el fagocito dispone del receptor CR1).

Las actividades antimicrobianas se clasifican en:

- I. mecanismos dependientes de oxígeno:
 - A. intermediarios reactivos de oxígeno (ROI)
 - B. intermediarios reactivos de nitrógeno (RNI)
 - II. mecanismos independientes de oxígeno: proteínas antimicrobianas preformadas:
 - A. péptidos catiónicos como las defensinas
 - B. catepsina G (proteínasa neutra)
 - C. lisozima
 - D. lactoferrina (secuestra Fe y altera las proteínas de FeS.
- 2) Producción de citoquinas: Los macrófagos producen citoquinas que atraen a otras células, sobre todo a PMN neutrófilos. Como veremos, dichas citoquinas son las responsables de muchos de los efectos sistémicos de la inflamación (p. ej., la fiebre). También producen factores para fibroblastos y células endoteliales, que promueven la reparación de los tejidos dañados.

B) Papel de los fagocitos como células accesorias en las respuestas inmunes específicas:

1. Como células presentadoras de antígeno (APC): Como dijimos, no todo el Ag se degrada totalmente en la ruta endocítica. Como veremos oportunamente, quedan péptidos de unos 10 aminoácidos de longitud, que se asocian dentro del endosoma con moléculas MHC de tipo II. Los complejos (MHC-II + péptido) de la vesícula emigran a la membrana citoplásmica, con lo que quedan expuestos en la superficie del macrófago, listos para ser reconocidos por los linfocitos T_H específicos, para su activación.
2. Los macrófagos son activados por los linfocitos T_H . Los linfocitos T_H activados tras su contacto con las células presentadoras secretan a su vez citoquinas que activan a los macrófagos, con lo que éstos mejoran sus capacidades fagocíticas y destructivas. De esta forma, los macrófagos activados por citoquinas sirven como células efectoras de la inmunidad celular.
3. Los macrófagos activados son a menudo los efectores finales de las respuestas humorales. Conforme avanza la respuesta inmune, se produce IgG y se activa el complemento, los cuales sirven como opsoninas que ayudan al macrófago a sus funciones fagocíticas y citotóxicas (mejoras en un factor de 4.000). Por ello, el macrófago es frecuentemente el encargado final de eliminar al microorganismo en la rama humoral de la inmunidad.

En resumen, el macrófago cumple un papel central en el sistema inmune, participando tanto en la fase de reconocimiento como en la de presentación del Ag y en la efectora.

Células dendríticas

Son células con morfologías características: del cuerpo celular salen unas prolongaciones alargadas, lo que le da aspecto parecido a los de las células dendríticas nerviosas. Al menos dos tipos de desarrollo en de la célula dendrítica ha sido identificado en ratón, origen mieloide y linfoide. La evidencia que apoya el origen mieloide ha sido obtenida en estudios *in vitro*, en los que se ha observado que los precursores mieloides dan lugar a granulocitos/monocitos y células dendríticas mieloides bajo la influencia del

factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF). Por otra parte, se ha visto que estas células, también tienen su origen a partir de precursores linfoides; al transfundir poblaciones de precursores linfoides en ratones previamente irradiados (con la finalidad de abatir la médula ósea), se observa el desarrollo de células B, T asesinas naturales y células dendríticas que expresan la molécula de superficie CD8 α . La capacidad de generar células dendríticas sin producir células asesinas naturales o linfocitos B se mantiene a la baja por una producción de la población de pre - linfocitos T CD44, CD25; CD3, sugiriendo que las células dendríticas están más ligadas a las células T que a las asesinas naturales o los linfocitos B. Las células dendríticas linfoides, son diferentes en relación al fenotipo, localización y función a las mieloides; no obstante que ambas subpoblaciones expresan altos niveles de CD11c, moléculas de clase II del MHC, y moléculas coestimuladoras CD86 y CD40, el que realza la mayor diferencia para distinguirlas es la expresión de las moléculas CD8 α , DEC-205 y CD1d, las cuales solo están presentes en las células dendríticas de origen linfoide y se encuentran ausentes en las de origen mielóide. Las células dendríticas de origen linfoide se localizan en áreas ricas en linfocitos T como: bazo e hígado; en contrasten las células dendríticas de origen mielóide se localizan en las zonas marginales de los órganos linfáticos (Banchemau *et al.* 2000).

En humanos, la heterogeneidad de estas células se releja en cuatro niveles: A) Poblaciones precursoras. Al menos dos subtipos de células dendríticas circulan en la sangre: precursores monocitos CD14+, CD11+ y CD11-, IL3R α +. B) localización anatómica: El nivel de heterogeneidad está reflejado por la localización anatómica, en la que se incluye a la epidermis, con las células de Langerhans, el epitelio intestinal (células dendríticas intestinales), el bazo (células dendríticas interdigitantes en la zona marginal, células dendríticas del centro germinal), el timo, el hígado y la sangre periférica. De todas estas células, no se ha podido establecer su origen, estados de maduración y diferencias funcionales. C) función: Tanto en ratón como en el humano, las células dendríticas tienen diferentes funciones, particularmente en la regulación de la proliferación del linfocito B y la diferenciación del linfocito T tipo 1 o tipo 2. D) Participación en la respuesta inmune: el principal papel de estas células es la fagocitosis altamente eficiente, así como la inducción a la tolerancia (Banchemau *et al.* 2000).

Existen dos tipos de células dendríticas, con funciones y propiedades diferentes, aunque ninguna presenta una actividad fagocítica importante.

Células dendríticas interdigitantes.

Aparentemente derivan de precursores mieloides de la médula ósea. Están presentes en los intersticios de la mayor parte de los órganos (corazón, pulmón, hígado, riñón, tracto gastrointestinal).

El prototipo es la célula de Langerhans de la piel, muy rica en MHC-II. Cuando entran en contacto con un Ag, migran como células "a vela" por los vasos linfáticos aferentes hasta llegar a la paracorteza de los ganglios linfáticos regionales, donde se convierten en células dendríticas interdigitantes. Allí presentan el Ag a los linfocitos T_H, para que se inicie la respuesta inmune. Parece ser que las células de Langerhans son también las precursoras de las células dendríticas interdigitantes de los órganos citados anteriormente, y de las de las áreas ricas en células T del bazo y del timo.

Estas células dendríticas son las más potentes inductoras de respuestas inmunes restringidas por MHC-II. Además, son mejores que otras células presentadoras en la misión de presentar autoepitopos procesados a las células T restringidas por MHC-II, por lo que juegan un papel importante en la autotolerancia.

Células dendríticas foliculares.

No derivan de la médula ósea, y no parece que tengan que ver con las dendríticas interdigitantes. Están presentes en los folículos secundarios de las áreas ricas en células B de los ganglios y del bazo, así como en los folículos linfoides asociados a mucosas.

No tienen moléculas MHC-II en su superficie, pero presentan gran cantidad de receptores para el complemento (CR1 y CR2) y para las IgG (el Fcγ R). Los inmunocomplejos (complejos Ag-Ac) llegan a las áreas de células B de estos órganos linfoides secundarios, y allí quedan retenidos un cierto tiempo: se unen a los receptores para Fc de estas células, que son muy abundantes en sus "perlas" (engrosamientos esféricos espaciados regularmente a lo largo de sus prolongaciones). Parece que estas células desempeñan un papel esencial en el desarrollo de las células B de memoria.

Eosinófilos.

Son granulocitos (es decir, PMN) presentes en sangre y tejidos, y constituyen del 1 al 3% de los leucocitos del individuo sano. Poseen núcleo bilobulado, citoplasma con abundantes gránulos de contenido básico, por lo que se tiñen regularmente con colorantes ácidos como la eosina. Estos gránulos están rodeados de membrana, pero al microscopio electrónico muestran en su interior unos cristaloides. Son células móviles que pueden migrar desde la sangre a los tejidos, atraídas por factores quimiotácticos (como el ECF-A)... Aunque tienen algún papel fagocítico, éste es mucho menos importante que en los neutrófilos. Su función principal es la defensa inespecífica frente a grandes parásitos, como helmintos: se unen a las larvas esquistosómulas de helmintos previamente recubiertas por IgE o IgG, y entonces se degranulan, vertiendo una toxina (proteína básica) y enzimas que controlan la respuesta inflamatoria, hidrolizando factores anafilácticos liberados por los mastocitos (figura 10).

Basófilos y mastocitos

Constituyen menos del 1% de los leucocitos, su núcleo es bi o multilobulado (basófilo) o redondeado (mastocito). Poseen abundantes gránulos azul-violeta, densos a los electrones, carecen de función fagocítica. Parece que los mastocitos derivan de la misma rama que los basófilos, pero mientras estos últimos son circulantes, los mastocitos residen en los tejidos. Ambos poseen abundantes receptores Fcε R1. Juegan un papel central en la hipersensibilidad inmediata (llamada de tipo I, que incluye las alergias): el entrecruzamiento de alérgeno con dos o más moléculas de IgE unidas a la célula provoca la rápida y total desgranulación, con lo que se liberan sustancias farmacológicamente activas, incluyendo la histamina, que es la responsable principal de los síntomas

alérgicos. A pesar de este papel "negativo", su misión natural positiva estriba en proporcionar protección frente a parásitos multicelulares (figura 10).

Plaquetas.

Son células anucleadas, que derivan de los megacariocitos de la médula ósea. Su papel principal consiste en intervenir en la coagulación de la sangre. También tienen participación en los procesos de inflamación: cuando existe daño a las células endoteliales, las plaquetas se adhieren al tejido lesionado y se agregan, liberando sustancias que incrementan la permeabilidad, y factores que activan el complemento, con lo que logran atraer a leucocitos (figura 10).

Eritrocitos.

Los eritrocitos son células anucleadas en forma de disco biconcavo con un diámetro de 7 a 8 μm de diámetro y de 1.5 a 2.5 μm de espesor y con un volumen de 90 fl. Debido a la carencia de núcleo estas células no son capaces de sintetizar proteínas; no obstante no presentar mitocondrias, tiene mecanismos alternos (de limitada eficiencia) a través de su microvasculatura para autosustentarse. La principal función del eritrocito es transportar oxígeno de los pulmones a los tejidos, donde a cambio recoge el bióxido de carbono resultante de la respiración. Los eritrocitos son altamente flexibles y capaces de deformarse, permitiendo realizar cambios en la forma para poder transitar a través de la microcirculación (figura 10).

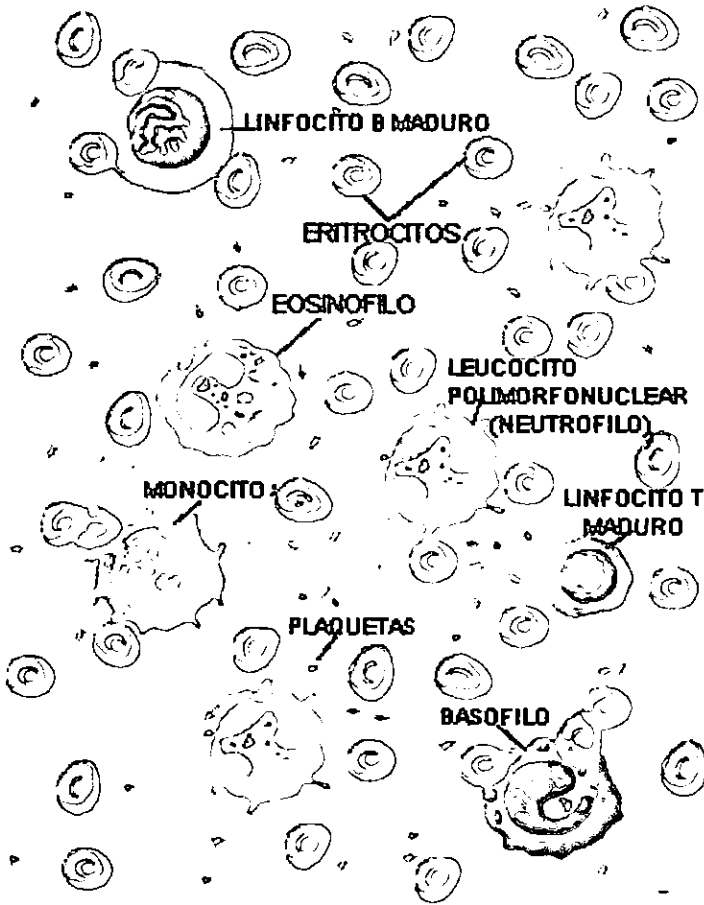


Figura 10. Esquema de las diferentes células de la sangre en el hombre. Fuente: David C. Dale 1998. En Scientific American: Medicina capítulo 14, 1998.

Anemia Aplástica.

La incidencia de este padecimiento es escasa, por lo que se considera como un padecimiento raro, no obstante se estima que la incidencia en México (en 1997) fue de 56 pacientes, de los que 52 fueron adultos y cuatro fueron niños (Ferrer *et al.* 1998). La anemia aplástica se caracteriza por pancitopenia e hipocelularidad variable de la médula ósea en ausencia de enfermedad maligna mieloproliferativa (tabla 1). En la mayoría de los casos, la actividad de la médula ósea (MO) queda reducida a pequeños islotes rodeados por tejido graso (figuras 11, 12). Según el grupo internacional para el estudio de la AA existen criterios para su clasificación como: AA leve, moderada y grave, lo que está en función del grado de celularidad medular (Teramura 1996; Young & Maciejewski 1997).

I. Anemia Aplástica grave

A. Pancitopenia periférica (por lo menos debe haber dos criterios)

- 1) Número de reticulocitos < 1% cuando se corrige a un hematocrito de 40% (40 000 / μ l)
- 2) Número de granulocitos < 500 / μ l
- 3) Número de plaquetas < 20 000 / μ l

B. Hipoplasia de médula ósea (uno de los siguientes aspectos)

- 1) Biopsia notablemente hipocelular (< 25% de lo normal)
- 2) Biopsia ligeramente hipocelular (< 25-50% de lo normal, con < 50% de células hematopoyéticas y no neoplásicas)
- 3) Número de plaquetas < 100 000 / μ l

II. Anemia Aplástica moderada

A) Pancitopenia periférica (debe haber por lo menos dos aspectos)

- 1) Número de reticulocitos < 1% (40 000 / μ l)
- 2) Número de granulocitos menor de 1500 / μ l

B) Hipoplasia de la médula ósea: menos del 30% del número normal de células hematopoyéticas en la biopsia

III. Anemia Aplástica leve

A) Pancitopenia periférica

- 1) Hematócrito < 38%
- 2) Número de granulocitos < 1800 / μ l
- 3) Número de plaquetas < 140 000 / μ l

B) Al menos una biopsia de médula ósea hipocelular

Tabla 1 Criterios para definir los casos de anemia aplástica severa, hipocelularidad medular severa o hipocelularidad moderada según el Grupo Internacional de Estudio de la Anemia Aplástica (Teramura 1996; Young & Maciejewski 1997).

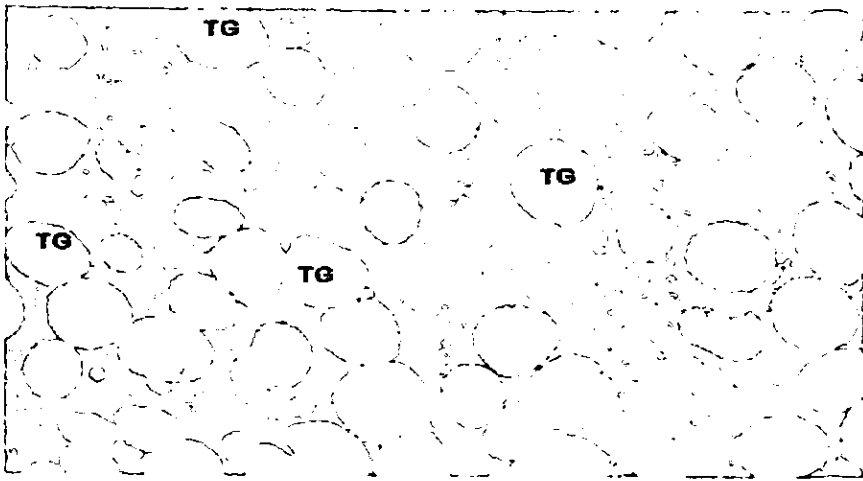


Figura 11. Extendido de médula ósea de un paciente sano. Se observa heterogeneidad celular. Tinción: May Grunwald-Giemsa. 200x. Clave: TG: Tejido graso, TH: Tejido hematopoyético. Disponible en: <http://pathy.med.nagoya-u.ac.jp/atlasdoc/atlas.html>.

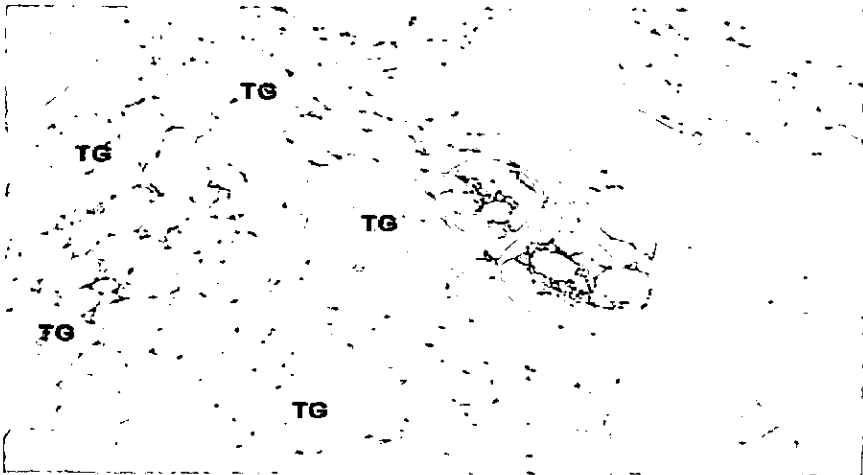


Figura 12. Extendido de médula ósea de un paciente con anemia aplásica. Se observa hipocelularidad celular severa y pequeños agregados de células hematopoyéticas rodeadas por tejido graso. Tinción: May Grunwald-Giemsa. 100x. Clave: TG: Tejido graso, TH: Tejido Hematopoyético, VS: Vaso sanguíneo. Disponible en: <http://pathy.med.nagoya-u.ac.jp/atlasdoc/atlas.html>.

Patogenia

La alteración que origina la AA, puede ser resultado de anomalías en por lo menos cuatro niveles distintos del funcionamiento de las células tallo pluripotenciales (stem) del tejido hematopoyético:

A) Disminución del número de ciclos celulares o alteración de su funcionamiento en las células tronco totipotenciales stem, debido principalmente a factores externos como la exposición a radiaciones ionizantes; fármacos como el cloranfenicol y la naproxenamida; agentes biológicos como el virus causante de la hepatitis C y agentes químicos como piretroides, tolueno, xileno, antraceno y benceno; asociándose éste último con mayor frecuencia como causante de aplasia medular debido principalmente a toxicidad directa del solvente o sus metabolitos secundarios (benzoquinona, ácidos mucónico y mucurónico, ácido fenil mercaptúrico y trihidroxibenceno entre otros) sobre la célula tallo totipotencial "stem" (IPSC 1993, Fernández *et al.* 1985; Teramura & Mizoguchi 1996; Young 1997). Por otra parte, existen causas intrínsecas como lo han demostrado las investigaciones de Philpott y colaboradores (1995), Laveder y Marcolongo (1996) quienes reportan que una desregulación en la tasa de muerte celular programada de las células tallo multipotenciales "stem" podría estar involucrado en la fisiopatología del desarrollo de la AA, asimismo, Callera y Falcao (1997) reportan un aumento de la muerte celular programada en células mononucleares de la médula ósea de pacientes con AA, por otra parte Marsh (1996) observa un incremento de la tasa de apoptosis en cultivos de células de la médula ósea de pacientes con AA.

B) Anomalías en el microambiente de la médula ósea que sirve de soporte para la diferenciación de los progenitores hematopoyéticos. Dichas anomalías pueden ser debidas al efecto directo de factores internos como las especies reactivas de oxígeno (peróxido de hidrógeno, ion oxidrilo, anión superóxido y óxido nítrico) que son tóxicos para las células hematopoyéticas, la ausencia de o alteración de factores de crecimiento y citocinas o bien factores externos como los mencionados anteriormente, de los cuales el benceno es el solvente con mayor grado de asociación a éste tipo de alteraciones ya que por su alta afinidad por el tejido graso, los metabolitos secundarios de éste compuesto (benzoquinona, ácidos mucónico y mucurónico, ácido fenil mercaptúrico y trihidroxibenceno entre otros) permanecen por periodos prolongados ocasionando daño

estructural y funcional irreparable en la mayoría de las ocasiones en el estroma de la médula ósea (Fernández *et al.* 1985; Morales *et al.* 1992; Tramura & Mizoguchi 1996; Young 1997). En la figura 7 se muestra el aspecto normal del microambiente hematopoyético (donde tiene lugar la formación de las diversas estirpes celulares de la sangre periférica), la distribución de las células "stem" y su incorporación a la circulación.

C) Función inadecuada de los reguladores celulares de la hematopoyesis linfocitos T (los que en algunas ocasiones llegan a reconocer como extraño el tejido hematopoyético propio estableciendo una respuesta de rechazo, ocasionando destrucción de las células multipotenciales "stem" dando lugar a pancitopenias aplásicas) y sus linfocitocinas (IL 1-6) Es importante indicar, que estas alteraciones en la línea linfóide pueden ser ocasionadas por procesos de toxicidad por solventes como el benceno, el cual se ha demostrado tiene efectos directos sobre la formación y función de las células del sistema linfopoyético ocasionando linfocitopenias severas e inactivación de la función celular, humoral y secretora de éstas células (Fernández *et al.* 1985; Morales *et al.* 1992; Teramura & Mizoguchi 1993; Young 1997).

D) Inhibición inmunológica de la hematopoyesis, debida al mal funcionamiento del sistema inmune que reconoce lo propio como extraño, montando una respuesta celular y/o humoral en contra de la célula tallo totipotencial "stem", en la que intervienen diversas poblaciones de linfocitos T (ayudantes y cooperadores), linfocitos B, células asesinas naturales y macrófagos, además de moléculas como citocinas inmunoglobulinas, interferones, receptores y moléculas accesorias, las cuales pueden tener un efecto directo sobre la célula blanco o bien producir una mayor activación de la respuesta inmune local por medio de las interleucinas (Fernández *et al.* 1985; Morales *et al.* 1992; Teramura & Mizoguchi 1996; Young 1997). Es importante mencionar que el fenómeno autoinmune es indispensable para mantener la integridad del organismo, en primer lugar previniendo una respuesta inmune contra lo propio por medio de la tolerancia: como es la eliminación de los linfocitos T autorreactivos, la anergia clonal de linfocitos T y la selección negativa en el caso de los linfocitos B; así mismo, continuamente el sistema inmunológico retira de la circulación a todas aquellas células que han cumplido su ciclo y que se encuentran incapacitadas para realizar de manera óptima sus funciones específicas como pueden ser: el transporte de oxígeno por los

eritrocitos, la capacidad de aglutinación para impedir hemorragias y sangrados por parte de los trombocitos o la eliminación de agentes externos al organismo por parte de los granulocitos y macrófagos; estos últimos una vez agotada su capacidad fagocítica, se tornan en agentes altamente tóxicos que de no ser retirados de la circulación y procesados adecuadamente causarían grandes estragos a nivel celular y tisular. Por otra parte el sistema inmune es también responsable de identificar, inactivar y destruir a todas aquellas células transformadas presentes en la circulación, que podrían dar origen a ciertos tipos de cáncer (Fernández *et al.* 1985; Morales *et al.* 1992; Teramura & Mizoguchi 1996; Young 1997).

Observaciones clínicas realizadas a principios de los años setenta (Teramura & Mizoguchi 1996; Young 1997). llevaron a proponer la hipótesis de que diferentes mecanismos inmunes son responsables de la presencia de la AA en la mayoría de los pacientes. Las observaciones más relevantes fueron, entre otras; que el trasplante de médula ósea (TMO) singénico en casos de AA grave requería en mas del 50% de los casos, inmunosupresión previa para lograr el implante y funcionamiento del injerto. Otro aspecto importante fue que los pacientes que recibieron ciclofosfamida (CFA) en preparación para el TMO alogénico experimentaron recuperación autóloga de la hematopoyesis. Evidencia adicional fue que la globulina antilinfocitaria (GAL) como régimen de inmunosupresión pretrasplante, empleando la infusión de médula ósea (MO) de un donador idéntico en un haplotipo con el receptor, provocaba la recuperación total o parcial de la hematopoyesis. Sin embargo lo anterior no se consideró como evidencia suficiente de que un mecanismo inmune provocaba la AA, lo que obligó al desarrollo de pruebas *in vitro* que corroboraran tal hipótesis, lo que se logró con cultivos y cocultivos de MO. La MO de los individuos con anemia aplásica, mostraba un crecimiento celular escaso o nulo, lo que también ocurría al cultivarlas con MO de sujetos sanos; se demostró que la inhibición del crecimiento celular dependía de los linfocitos T de los pacientes, pues en ambos casos el crecimiento celular era normal al sustraerlos antes del cultivo. También se demostró que en algunos enfermos existía linfocitotoxicidad en contra de sus propias células hematopoyéticas, postulándose como mecanismo de la AA un desequilibrio entre linfocitos "supresores" y linfocitos citotóxicos, permitiendo que estos últimos destruyeran células mononucleares y células tronco hematopoyéticas modificadas como agentes extrínsecos como virus, fármacos y otros agentes

considerados en la etiología del padecimiento (Teramura & Mizoguchi 1996; Young 1997).

En pacientes con AA se describió una producción anormal de linfocinas por sus células mononucleares relacionadas con la regulación de la hematopoyesis (IL-2 y su receptor en la células T circulante, y una disminución en la producción de IL-1 en monocitos). Estudios de biología molecular han demostrado que los mecanismos de muerte celular programada o apoptosis se encuentra alterada de manera significativa por la sobre expresión de antioncogenes o señales regulatorias del ciclo celular (Fernández *et al.* 1985; Morales *et al.* 1992; Biczak *et al.* 1993; Teramura & Mizoguchi 1996; Young 1997; Laveder & Marcolongo 1996; Callera & Falcao 1997; Philpott *et al.* 1995).

De los cuatro niveles distintos del funcionamiento de la célula pluripotencial (stem) del tejido hematopoyético que al alterarse pueden dar origen a la AA, en tres de ellos se observa la presencia del benceno y sus metabolitos secundarios (fenol, benzoquinona, hidroquinona, ácidos mucónico, mucurónico y fenil mercaptúrico, además del trihidroxibenceno entre otros) que debido a sus múltiples vías de acceso al organismo, su afinidad por el tejido graso, su gran tiempo de residencia y su potencial de inducción de alteraciones a nivel oxidativo y de ácidos nucleicos; son capaces de provocar citotoxicidad y muerte de las células tallo multipotenciales "stem", disminuir su capacidad de proliferación; así como alterar física y funcionalmente el microambiente hematopoyético que sirve de soporte para la diferenciación de los progenitores sanguíneos, inhibiendo el funcionamiento de los reguladores celulares de la hematopoyésis (Interleucinas ILs, Citocinas y factores de crecimiento hematopoyético (CSF, GM-CSF, M-SCF, Meg-CSF, Epo). Por estas razones el benceno, además de ser estudiado como carcinogénico, es también considerado como agente etiológico de la anemia aplásica en humanos.

Diagnóstico.

Debido a que la AA no es una entidad estática, para el diagnóstico deben tomarse en cuenta varios aspectos como son los datos clínicos, el análisis biológico y el análisis diferencial del paciente para determinar el grado de severidad de la enfermedad.

La anemia aplásica presenta un comienzo insidioso hasta que la enfermedad se manifiesta a través de los síntomas clínicos secundarios a la falla de una o más líneas hematopoyéticas. Puede presentarse anemia de insaturación lenta y progresiva por falta de producción de eritrocitos que puede verse exacerbada por pérdida brusca a través de sangrado. En esta etapa el estudio de la sangre periférica revela anemia normocrómica, normocítica o moderadamente macrocítica, con reticulocitos disminuidos. La presencia de células rojas nucleadas y alteraciones morfológicas de los eritrocitos sugieren otros diagnósticos como: infiltración medular, mielofibrosis, vasculitis (Fernández *et al.* 1985; Morales *et al.* 1992; Teramura & Mizoguchi 1996; Young 1997).

Con frecuencia los síntomas de sangrado secundarios a trombocitopenia constituyen la manifestación inicial de la enfermedad, con la aparición de púrpura cutáneo mucosa, hematomas, epistaxis y gingivorragias. Mas adelante, conforme progresa la enfermedad, las hemorragias pueden aparecer a nivel digestivo, urinario, muscular y del sistema nervioso central, siendo esta última la que reviste mayor gravedad y la que con mayor frecuencia acaba con la vida del paciente. En esta etapa las plaquetas están constantemente disminuidas, sin presentar alteraciones morfológicas y son los últimos elementos en normalizarse cuando existe recuperación espontánea o terapéutica del cuadro. No se encuentran alteraciones en las pruebas de coagulación, salvo las dependientes de la concentración de plaquetas: tiempo de sangrado, retracción del coágulo y fragilidad capilar (Fernández *et al.* 1985; Morales *et al.* 1992; Teramura & Mizoguchi 1996; Young 1997).

La leucopenia se manifiesta a través de las infecciones cuyas localizaciones más habituales son: faringe, pulmón, recto, vías urinarias y piel. Las infecciones tienen un pronóstico muy grave, dado que se mantienen neutropenias intensas y prolongadas. Pueden ser debidas a bacterias gramnegativas en su mayoría, hongos y más raramente protozoos, se observan también infecciones víricas. En este caso, en la mayoría de los pacientes la leucopenia es intensa debida principalmente a una disminución de la concentración de neutrófilos (neutropenia), no encontrándose anomalías morfológicas en los granulocitos. El recuento de linfocitos puede ser normal en cifras absolutas cuando la leucopenia no es severa, pero habitualmente se encuentra linfocitopenia y monocitopenia (Fernández *et al.* 1985; Morales *et al.* 1992; Teramura & Mizoguchi 1996; Young 1997).

Ante el hallazgo de un cuadro de pancitopenia, con o sin manifestaciones clínicas asociadas, la investigación debe orientarse hacia el examen de la médula ósea. Los diferentes mecanismos de producción de pancitopenia se clasifican en centrales, periféricos y mixtos. Las pancitopenias de origen central se producen por:

- 1.- Fracaso de la hemopoyesis por falla de la producción celular: Anemia aplástica.
- 2.- Hemopoyesis ineficaz: Anemia refractaria, anemia megaloblástica.
- 3.- Invasión medular por células tumorales: Metástasis de carcinoma, de linfoma o infiltración por leucemia aguda.
- 4.- Depósito medular de células con acumulaciones patológicas de lípidos: Gaucher y Niemann-Pick.
- 5.- Invasión medular por histiocitos anormales: Histiocitosis sistémicas (Hand - Schüler-Christian, Letterer-Siwe).

Las pancitopenias periféricas pueden producirse por:

- 1.- Hiperesplenismo: Esplenomegalia congestiva, tesarismosis, granuloma y Kala azar.
- 2.- Infecciones: Tuberculosis miliar, micosis sistémicas, septicemia fulminante, paludismo, brucelosis, hepatitis Fernández *et al.* 1985; Morales *et al.* 1992; Teramura & Mizoguchi 1996; Young 1997).

Existe pancitopenia de mecanismo mixto central y periférico como la hemoglobinuria paroxística nocturna, por lo que el estudio de la médula ósea será decisivo para el diagnóstico de la anemia aplástica (Fernández *et al.* 1985; Williams *et al.* 1990; Hammening *et al.* 1990; Morales *et al.* 1992; Biczak *et al.* 1993; Hoffbrand *et al.* 1993; Young 1997; Laveder & Marcolongo 1996).

A causa de la disminución de la eritropoyesis existe un aumento del hierro sérico y de la saturación de la transferrina; la ferrocinética revela un alargamiento del tiempo de aclaramiento del hierro y una incorporación disminuida de éste a los eritrocitos. Este patrón es típico de la AA, pero no es necesario para su diagnóstico. La médula ósea es fundamental para establecer el diagnóstico de la anemia aplástica ya que el cuadro hematológico periférico descrito puede aparecer en otras entidades, el estudio de la médula ósea debe realizarse por aspiración y biopsia, la muestra del aspirado debe

procesarse con tinciones para elementos celulares, hierro, reticulina y colágena, siendo siempre imprescindible para el diagnóstico, ya que permite la valoración cuantitativa y cualitativa exacta de la celularidad medular y del contenido en grasa. El aspirado medular no siempre es representativo de la celularidad global, ya que en la anemia aplásica pueden existir focos residuales de hematopoyesis y la muestra obtenida refleja esta situación conduciendo a errores en el diagnóstico. De manera general, los hallazgos habituales consisten en: hipocelularidad, aumento de la grasa, disminución de las series eritro y granulopoyéticas, casi desaparición de los megacariocitos, linfocitosis, plasmocitosis y presencia de mastocitos. La biopsia confirma la hipocelularidad medular y el aumento de las lagunas grasas, y pueden observarse a veces islotes aislados de eritro y granulopoyesis. Los megacariocitos están prácticamente ausentes. La tinción de Perls muestra un aumento del hierro no eritroblástico y las de Gomori y Masson descartan el aumento de fibras reticulínicas y colágenas, respectivamente. La citogenética es, en la mayoría de los casos, normal a excepción de la anemia de Fanconi que revela ciertas roturas cromosómicas (Fernández *et al* 1985; Morales *et al* 1992; Bicjk *et al* 1993; Teramra & Mizoguchi 1996; Young 1997).

A estas manifestaciones hay que añadir otras específicas de los cuadros constitucionales congénitos (Williams *et al* 1990; Hammening *et al* 1990; Morales *et al* 1992; Bicjk *et al* 1993; Hoffbrand *et al* 1993; Young 1997) como son:

- 1 Anemia de Fanconi. Los pacientes afectados por este tipo de anemia presentan hiperpigmentación cutánea, hipoplasia de pulgares, alteraciones estructurales de los riñones, aplasia del radio, microcefalia, microftalmia, retraso mental, estrabismo y sordera. Estos caracteres se heredan de forma autosómica recesiva y pueden estar presentes en los parientes del paciente sin acompañarse de alteraciones hematológicas. La alteración básica de la Anemia de Fanconi está a nivel de la célula madre, como se evidencia con las unidades formadoras de colonias en cultivos celulares. Las alteraciones hematológicas se presentan generalmente entre los 5 - 10 años de edad. Los casos, homocigotos presentan todas las alteraciones descritas.
- 2 Disqueratocitosis congénita. Se caracteriza por alteraciones cutáneas que aparecen en los primeros 10 años de vida. Se observa hiperpigmentación reticular, distrofia de

las uñas y leucoplasia de las mucosas. Afecta al varón con una incidencia de 10 hombres por cada mujer, lo que sugiere que la transmisión de la enfermedad está ligada al cromosoma X. Las alteraciones hematológicas se presentan en la segunda década y solo en la mitad de los casos aproximadamente.

- 3 Síndrome de Schwachman Diamond. Se caracteriza por neutropenia, insuficiencia pancreática mala absorción y anemia aplásica solo en un tercio de los casos. Se transmite de forma autosómica recesiva y afecta por igual a ambos sexos.
- 4 Anemia aplásica familiar. Esta entidad engloba una serie de casos hallados dentro de una misma familia y no se acompaña de las alteraciones características de la anemia de Fanconi. Se ha visto asociada a déficit inmunológicos, neoplasias cutáneas, ataxia cerebelosa, preleucemia y leucemia aguda.
- 5 Trombocitopenia amegacariocítica. Se caracteriza por la ausencia total o parcial de megacariocitos al poco tiempo del nacimiento. Las manifestaciones clínicas son secundarias a la trombocitopenia, y la causa mayor de muerte son las complicaciones hemorrágicas. Los sobrevivientes desarrollan una anemia aplásica.

Algunos casos de anemia de Fanconi y Familiar inician con una trombocitopenia, lo que unido al escaso número de pacientes ligados a trombocitopenia amegacariocítica hacen difícil su definición como una entidad propia (Fernández *et al* 1985; Williams *et al* 1990; Hammening *et al* 1990; Morales *et al* 1992; Biczik *et al* 1993; Hoffbrand *et al* 1993; Young 1997).

Pronóstico.

Se ha intentado encontrar fórmulas que incluyen muy variados parámetros con el fin de valorar el pronóstico de los pacientes que padecen anemia aplásica. Los factores pronósticos son muy importantes al momento de definir la terapéutica a seguir. El Grupo Internacional de Estudio de la Anemia Aplásica utiliza cuatro criterios para definir los casos de anemia aplásica severa: hipocelularidad medular severa o hipocelularidad moderada con menos del 30% de células mielopoyéticas; recuento de neutrófilos inferior a 500 elementos/ μL ; plaquetas inferiores a 20 000/ μL y reticulocitopenia inferior a 1%

corregida según hematocrito, en presencia de anemia (tabla 1). Estos hallazgos en sangre periférica deben constatar en recuentos hematológicos sucesivos. La severidad de la anemia aplásica queda definida por la presencia de médula ósea hipocelular y al menos dos de los hallazgos mencionados en sangre periférica. La evolución en la mayoría de los casos de anemia aplásica severa es rápidamente fatal en los primeros 3-6 meses. En las formas moderadas o leves la supervivencia es mayor e incluso pueden darse casos de recuperación espontánea (Fernández *et al.* 1985; Morales *et al.* 1992; Teramura & Mizoguchi 1996; Young 1997).

Tratamiento.

Con la finalidad de restaurar la hematopoyesis normal, el tratamiento de la anemia aplásica consta de tres aspectos principales (Fernández *et al.* 1985; Morales *et al.* 1992; Teramura & Mizoguchi 1996; Young 1997).

1. Identificación, evaluación y eliminación de los agentes etiológicos.

Es el primer paso en el manejo de la anemia aplásica, debido a que en casos moderados o leves de esta enfermedad la hematopoyesis puede retornar a su estado normal después de suspender el contacto con el agente causal. Sin embargo, la simple suspensión del contacto con el agente causal en algunos casos no es suficiente, ya que no se conoce el modo de acción del agente causal y la capacidad del paciente para metabolizarlo y eliminarlo (Fernández *et al.* 1985; Williams *et al.* 1990; Hammening *et al.* 1990; Morales *et al.* 1992; Bick *et al.* 1993; Hoffbrand *et al.* 1993; Young 1997).

2. La terapia de soporte.

Es empleada cuando los síntomas y complicaciones de la anemia aplásica se relacionan con deficiencias de eritrocitos, plaquetas y granulocitos; cada uno de estos elementos o todos en conjunto pueden ser reemplazados por medio de transfusiones sanguíneas completas o transfusiones de concentrados celulares específicos como los eritrocitos, plaquetas, granulocitos, linfocitos; no obstante, este tipo de tratamiento, no ofrece una cura al padecimiento, ya que no reestablece el funcionamiento normal de los precursores hematopoyéticos en la médula ósea y además conlleva una serie de efectos colaterales, dentro de los que se encuentran, la sensibilización del sistema inmune del paciente para reaccionar contra células ajenas, lo que aumenta las posibilidades de

rechazo de futuros trasplantes de médula ósea y por otra parte las fracciones leucocitarias transfundidas presentan la posibilidad de reconocer al receptor como tejido extraño y montar una respuesta inmune sistémica en contra del paciente (Fernández *et al.* 1985; Williams *et al.* 1990; Hammening *et al.* 1990; Morales *et al.* 1992; Bick *et al.* 1993; Hoffbrand *et al.* 1993; Young 1997).

3. Restauración de la hematopoyesis anormal

En última instancia la supervivencia de los pacientes con anemia aplásica depende de una recuperación en la función normal de la médula ósea. Se han propuesto algunos tratamientos para la restauración de la hematopoyesis de enfermos con esta enfermedad (Fernández *et al.* 1985; Morales *et al.* 1992; Teramura & Mizoguchi 1996; Young 1997):

Andrógenos: Testosterona, Oxymetolona, fluoxymesterona y nandrolona.

Glucocorticoides: Metilprednisolona.

Litio.

Inmunosupresión: Ciclosporina A (Cys A), Ciclofosfamida, Globulina antilinfocitaria (GAL) y Globulina antitimocitaria (GAT).

Reguladores hematopoyéticos de acción positiva: Interleucinas (IL) IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, factores estimulantes de colonias (CSF): Factor estimulante de granulocitos (CSF-G), Factor estimulante de macrófagos (CSF-M), Factor estimulante de granulocitos

No obstante, ninguno de ellos ofrece por si solo una alternativa de restauración total definitiva de la hematopoyesis, por lo que en la mayoría de los casos se emplean combinados de medicamentos que si bien ofrecen resultados alentadores, conllevan efectos colaterales diversos como hepatotoxicidad, nefropatías, hipertensión arterial entre otros (Fernández *et al.* 1985; Morales *et al.* 1992; Teramura & Mizoguchi 1996; Young 1997):

Trasplante de médula ósea.

Debido a que en la anemia aplásica se observa un marcado déficit en la producción y función de las células hematopoyéticas medulares se ha propuesto el trasplante de médula ósea (TMO) cuyo objetivo es reemplazar el tejido hematopoyético

dañado con un sistema funcional nuevo, además de ser el tratamiento de preferencia para los casos de anemia aplásica severa, dependiendo de la factibilidad de un donador apropiado, se realizará cualquiera de los diferentes tipos de trasplante (Stewart 1992; Donald 1995).

Trasplante singénico de médula ósea.

Este tipo de trasplante es viable para aquellos pacientes que tienen un gemelo idéntico, debido a que son idénticos histocompatiblemente (HLA) en una región del brazo corto del cromosoma 6 (Stewart 1992; Donald 1995).

Trasplante alogénico de médula ósea.

En este tratamiento un paciente recibe la médula ósea a partir de un donador con HLA (de clase I y II) similar, pudiendo ser de un pariente (hermano, padre, madre, primo); en este caso la posibilidad de supervivencia es del 80% (Stewart 1992; Donald 1995).

Trasplante alogénico sin alta similitud de HLA.

Recientemente, se ha sugerido que este tipo de tratamiento, en el cual los antígenos HLA del donador no son similares con los del paciente resulta en algunos casos eficaz para el tratamiento de la anemia aplásica (Stewart 1992; Donald 1995).

Para abatir la posibilidad de rechazo o complicaciones de otro tipo, el donador debería coincidir perfectamente con el receptor, el tipo sanguíneo es también tipificado, aunque este sistema no es una barrera para realizar el trasplante de médula (Stewart 1992; Donald 1995).

Pruebas de histocompatibilidad.

En estas pruebas de laboratorio, se involucra la región HLA la que es una serie de genes ligados cercanamente en el brazo corto del cromosoma 6 (figura 13 y 14), cada persona presenta dos haplotipos, un arreglo de genes codificados en un solo cromosoma, uno inherente a cada progenitor por lo que en una familia hay cuatro haplotipos posibles; cada par de hermanos tiene una probabilidad de 1:4 de ser HLA idéntico en algunas regiones. Actualmente, técnicas serológicas o reacciones de linfocitos son usadas para detectar los antígenos codificados en los locus HLA-A, HLA-B,

HLA-C en las moléculas de histocompatibilidad de clase I; mientras que para los antígenos de clase II se detectan por técnicas de Biología molecular los antígenos en los locus : HLA-DRA, HLA-DRB1, HLA-DRB3, HLA-DRB4, HLA-DRB5, HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-DPA1, HLA-DPB1, HLA-DMA, HLA-DMB; y otros como TAP1, TAP2 y LMP2; estos locus representan el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), que media el reconocimiento de lo propio y lo extraño (Stewart 1992; Donald 1995).

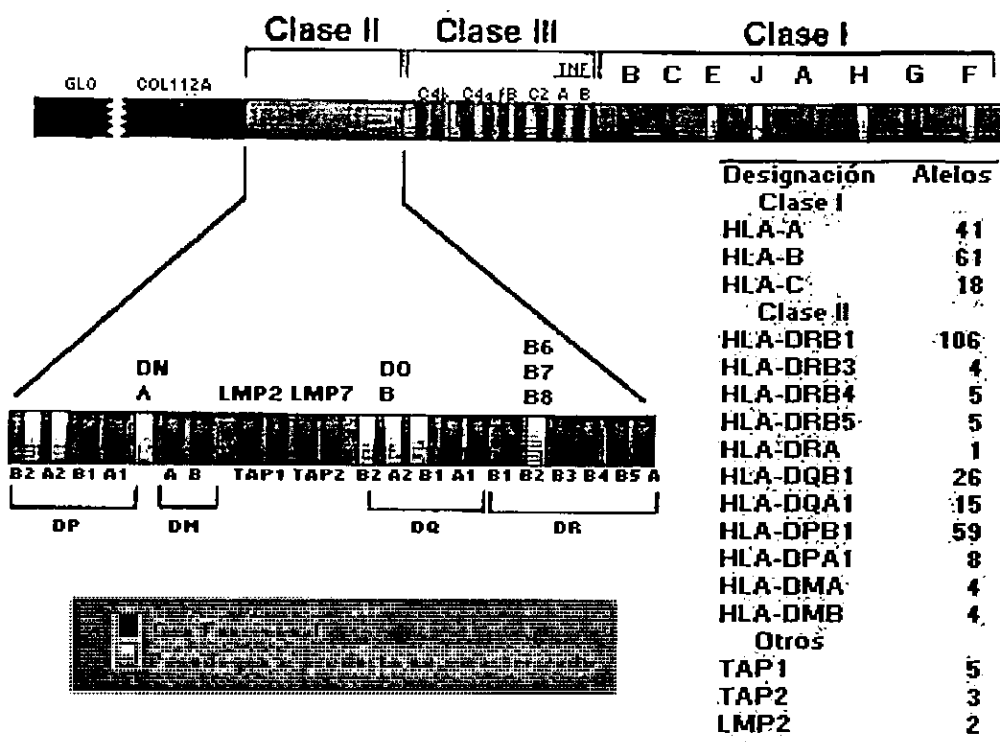


Figura 13. Esquema simplificado del complejo principal de histocompatibilidad en humano. En la parte media se muestra una amplificación de la región clase II.

Fuente: Moreno 1996.

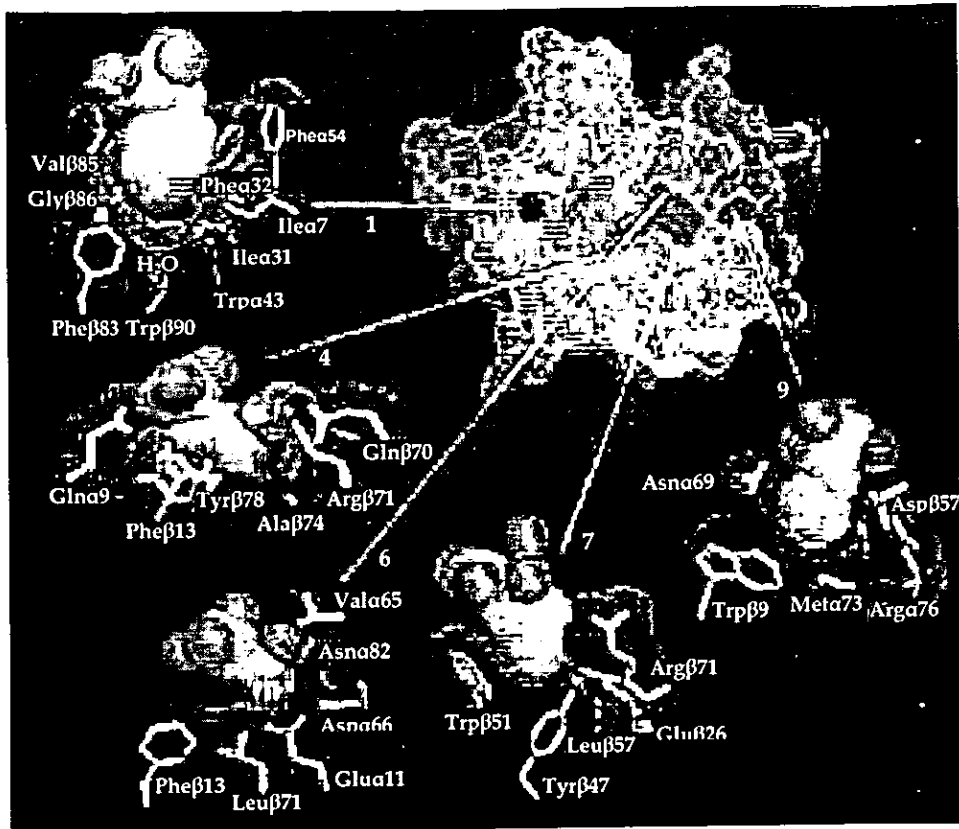


Figura 14. Molécula clase II del complejo principal de histocompatibilidad donde se unen los motivos (1, 4, 6, 7 y 9) del péptido inmunogénico. Fuente: Moreno 1996.

Régimen de acondicionamiento pretransplante.

Una vez que se ha localizado un donador apropiado y su médula ha sido almacenada, el receptor inicia un régimen de acondicionamiento cuya función es destruir la médula ósea remanente, preparando así el transplante de un nuevo sistema inmune. La erradicación del sistema inmune es necesaria para prevenir el rechazo del injerto y permitir el reemplazo de los sistemas hematológico e inmune del receptor por el del donador. El régimen preparatorio más común para los pacientes con anemia aplásica que recibirán transplante de médula consiste en altas dosis de ciclofosfamida, un agente antineoplásico; solo en algunos casos en los que se ha presentado un rechazo a un transplante previo, se realiza un procedimiento de irradiación corporal total. La irradiación total adiciona un régimen de acondicionamiento pretransplante ha mostrado disminuir el

riesgo de rechazo, aunque incrementa la incidencia y severidad de enfermedad de injerto contra el huésped (aguda y crónica) Stewart 1992; Donald 1995.

Consideraciones postransplante.

Inmediatamente después del trasplante, los pacientes no presentan función medular, por lo que no hay actividad del sistema inmune, debiendo permanecer en aislamiento total para prevenir infecciones. Las transfusiones de soporte son necesarias para evitar sangrados y mantener los niveles del hematocrito y la hemoglobina eliminando síntomas de anemia. Todos los productos sanguíneos deben ser irradiados para inactivar los linfocitos que pueden iniciar una respuesta de enfermedad de injerto contra el huésped (GVHD). Dos o tres semanas después del trasplante, la médula injertada inicia la producción de los elementos críticos de la sangre periférica y las precauciones pueden ser gradualmente descontinuadas tomando en cuenta la evidencia clínica y de laboratorio acerca de la regeneración de la médula. Un trasplante se considera exitoso cuando se observa un aumento en la concentración de granulocitos, seguido por un incremento en plaquetas y eritropoyesis eficaz. En los mejores casos, el aumento de los granulocitos se observa al rededor del día 40 - 50 posterior al trasplante, lo mismo que las plaquetas, la regularidad en el hematocrito indica la restauración completa de la hematopoyesis, se da aproximadamente 60 - 90 días posteriores al trasplante. En general la médula ósea restaurada es completamente del donador, aunque la funcionalidad de la médula del receptor puede persistir por algunas semanas; en muy raras ocasiones la médula ósea remanente del receptor, puede restituir la celularidad total eliminando completamente la médula del donador. Se ha observado que el microambiente medular es de origen hospedero y no donador; por otra parte, el sistema inmune humoral y celular permanece altamente comprometido durante 4 - 6 meses después del trasplante (Stewart 1992; Donald 1995).

Complicaciones.

La complicación más grave en el trasplante de médula ósea es la enfermedad de injerto contra el huésped (GVHD), la que en algunas ocasiones tiene efectos fatales, ya que la médula ósea del donador, reconoce como extraño el nuevo microambiente e intenta destruirlo, esta respuesta es debida a los antígenos menores de histocompatibilidad que no coinciden entre el donador y el receptor, no obstante, la

enfermedad de injerto contra el huésped puede ocurrir en trasplante realizados entre gemelos idénticos siendo el mecanismo de rechazo mucho mas complejo que el descrito originalmente. Los sitios principales de ataque son la piel, el tracto gastrointestinal, hígado y pulmones. La supervivencia es entonces directamente proporcional a la severidad de la enfermedad de injerto contra el huésped, en aquellos pacientes donde la enfermedad de injerto contra el huésped no es severa o inexistente tienen 90% de posibilidades de supervivencia comparado con 45% en aquellos en los que la enfermedad de injerto contra el huésped es profunda. La terapia posterior al trasplante involucra la inmunosupresión con el fin de mantener un balance entre el sistema inmune funcional y la prevención del daño causado por este mismo sistema. Los medicamentos empleados comúnmente para deprimir el sistema inmune son: Ciclosporina A (Cys A) la que es necesario administrar a dosis tóxicas para disminuir la enfermedad de injerto contra el huésped, aunque es usada para suprimir el sistema inmune posterior a un trasplante evitando la posibilidad del rechazo y aumentando la probabilidad de implantación del tejido nuevo. La administración de methotrexato, un antimetabolito y Cys A es el tratamiento más eficaz para disminuir la severidad de la enfermedad de injerto contra el huésped. Otras combinaciones usadas para tratar o prevenirla incluye Cys A, methotrexato plus prednisolona o agentes antineoplásicos (Stewart 1992; Donald 1995).

Ninguno de estos regímenes son efectivos en la disminución de la incidencia de la enfermedad de injerto contra el huésped crónica, la que puede presentarse de cualquier modo en los siguientes 2 - 15 meses posteriores al trasplante. Este padecimiento afecta 25 - 45% de los pacientes que sobreviven un poco mas de 180 días después del trasplante atacando principalmente la piel; en resumen a pesar de todas las complicaciones y efectos adversos mencionados, el trasplante de médula ósea permanece como la única terapia que ofrece una "cura" para pacientes con anemia aplásica severa.

Recientemente, se ha demostrado la presencia de células tronco pluripotenciales (stem) en circulación aunque en números menores, no obstante por medio de citometría de flujo y citoferesis es posible coleccionar la cantidad suficiente de células nucleadas en muestras de sangre y retornar el plasma y demás estirpes celulares a la circulación

periférica, pudiendo aislar por medio de anticuerpos monoclonales, la célula stem del donador, sin necesidad de un procedimiento quirúrgico. Otra fuente de células stem que ha recibido una atención especial es el cordón umbilical, observándose que de los pacientes transplantados con células provenientes de esta fuente solo el 10% han desarrollado GVHD que en la mayoría de los casos es de grado moderada (Stewart 1992; Donald 1995).

Transplante autólogo de médula ósea.

En esta modalidad de transplante, el paciente sirve como su propio donador, eliminando el problema de similitud de HLA para llevar a cabo el procedimiento de injerto de médula ósea. La médula ósea es usualmente removida a partir del propio paciente, estimulada con reguladores hematopoyéticos de acción positiva y almacenada para su posterior injerto, cuando el paciente presenta un estado de remisión ó bien cuando las células no presentan anomalías funcionales y/o morfológicas. La finalidad de la colecta, estimulación y almacenamiento es la purificación de células tallo totipotenciales stem que posteriormente darán origen a las diferentes unidades formadoras de colonias (eritrocitos, linfocitos, granulocitos y granulocitos macrófagos) para asegurar que no se transplante células deficientes o transformadas. No obstante los beneficios de esta técnica, el paciente no está exento de la preparación pretransplante con radio y quimioterapia, además de la terapia de soporte posterior al transplante (Stewart 1992; Donald 1995).

Transplante de células hemocoriales.

Debido a sus características de transporte e intercambio entre el feto y la madre, el cordón umbilical se ha constituido en una fuente alterna de células precursoras sanguíneas candidatas que permiten realizar transplante de células tallo pluripotenciales a pacientes con disfunción de la médula ósea. Una vez colectadas las células, son estimuladas con diversos factores de regulación hematopoyéticos de acción positiva para obtener las diferentes unidades formadoras de colonias y almacenadas para su posterior transplante; no obstante, su potencialidad y baja tasa de diferenciación a nivel de histocompatibilidad, el paciente no evita los regímenes de preparación pretransplante y la terapia de soporte posterior, aunque cabe resaltar que son empleados en menor grado, ofreciendo resultados alentadores (Stewart 1992; Donald 1995).

En los países desarrollados, los últimos procedimientos descritos se practican frecuentemente con gran éxito, sin embargo, debido a la tecnología y alto costo que implican, son inaccesibles para la mayoría de los pacientes en los países no desarrollados, por lo que esta enfermedad es causa de muerte en mayor número de los adultos que la padecen.

Debido a la baja incidencia de la anemia aplásica, se conoce poco acerca del mecanismo y nivel del benceno en el desarrollo de esta enfermedad, ya que el contacto primario con el paciente generalmente se realiza en estado avanzado, lo que imposibilita conocer los diferentes estados por los que puede cursar el paciente con este padecimiento. Por lo que se hace necesario profundizar en el conocimiento de la anemia aplásica y generar modelos de experimentación reproducibles para estudiarla bajo condiciones controladas en sus diferentes estados y probar diferentes alternativas terapéuticas.

Con este fin se han ensayado experimentalmente algunos esquemas con variaciones en las dosis, vías de administración y tiempo de exposición en diferentes especies como: conejo, cuyo, hámster, rata y ratón (IPCS 1993).

Inducción experimental de anemia aplásica con benceno en animales de laboratorio.

Para conocer el daño celular causado por el benceno en animales de laboratorio (rata y ratón), se utiliza con mas frecuencia la vía de exposición inhalatoria, debido a que la inhalación de los vapores de este solvente es la principal fuente de contacto en el hombre por el ambiente y su ámbito laboral, sin embargo los esquemas de tratamiento empleados difieren mucho entre sí, administrándose este solvente desde 10 a 9000 ppm durante 30 minutos hasta 7 horas por día en periodos de 3 a 100 semanas (tablas 2, 3), además por su difícil y costosa realización resulta poco práctica; alternativamente se han utilizado las vías oral y subcutánea, cuyos esquemas de tratamiento también difieren entre sí; por otra parte, las investigaciones realizadas en animales de experimentación han estado enfocadas principalmente a conocer el efecto del benceno sobre aspectos genéticos, metabólicos y fisiológicos, sugiriendo que este solvente puede inhibir o alterar

la síntesis o expresión de los ácidos desoxirribonucleico (ADN) y ribonucleico (ARN) e interferir en la maduración y división celular ocasionando hipo e hiperplasia celular y leucemia; reportando resultados que hasta el momento no son concluyentes (Dean 1985; Laskin & Leong 1977; Leong 1993; Birnbaum & Matthews 1980; Dutcher 1985) tablas 3-4.

Autor	Año	Especie	Dosis y tiempo de tratamiento	Resultados reportados
Svirbely et al.	1940	Rata	1000 ppm, 7 h/día x 28 semanas	Linfopenia moderada seguida leucocitosis y linfocitosis.
Deichmann et al.	1966	Rata	61-831 ppm/día x 2-4 semanas.	Leucopenia "significativa".
Nau et al.	1966	Rata	3200 ppm, 18 h/día x 13 semanas	Efectos hematológicos (eritrocitopenia y leucopenia) reversibles después de 6 meses de terminada la exposición.
Boje et al.	1970	Rata	400 ppm/día x 4 semanas.	Anemia moderada, leucocitosis, trombocitopenia, reticulocitosis y deplesión progresiva de células mielopoyéticas en médula ósea.
Jenkins et al.	1970	Rata	817 ppm/día x 30 días	Reducción moderada en la concentración de leucocitos en sangre periférica.
Snyder et al.	1978	Rata	960 ppm, 6h/día; 5 días/sem x 99 semanas	Aparición de tumores malignos en hígado y aparición en leucemia mielógena aguda.
Styles & Richardson	1984	Rata	3-3200 ppm, 6h/día x 1 día	Disminución moderada en la concentración de eritrocitos, plaquetas y leucocitos en sangre periférica.
Ward et al.	1985	Rata	3-960 ppm, 6h/día; 5 días/sem x 13 semanas	Cambios moderados en recuentos celulares en sangre periférica y disminución en la celularidad medular femoral.
Li et al.	1986	Rata	64-9600 ppm, 5h/día x 1-2 semanas	Incremento en la fosfatasa alcalina y disminución de leucocitos en sangre periférica a dosis > 960 ppm.
Maltoni et al.	1989	Rata	640 ppm, 4h/día; 5 días/sem x 7 semanas	Aparición de tumoraciones malignas en cavidad oral, glándula suprarrenal y mamaria, leucemia mielógena aguda, después de 150 semanas de terminada la exposición.

Tabla 2. Efectos de la administración de benceno por vía inhalatoria en rata (Fuente: American Petroleum Institute (A.P.I.) 1977 Editor Sidney Laskin, 1977; International Program on Chemical Safety (I.P.C. 1993).

Autor	Año	Especie	Dosis y tiempo de tratamiento	Resultados reportados
Jonek et al.	1969	Ratón	24 ppm, 6 h/día x 14 días	Reducción en la actividad de las enzimas succinato y lactato deshidrogenasa, G-6-fosfato deshidrogenasa, NADH-tetrazol reductasa y fosfatasa alcalina.
Horiguchi et al.	1972	Ratón	10, 100 y 1000 ppm, 6 h/día x 3 semanas	Alteraciones en la actividad leucocitaria (fagocitosis).
Snyder et al.	1980	Ratón	960 ppm, 6 h/día; 5 día/sem x tiempo de vida	Mortalidad por aplasia medular, con eritropenia, trombocitopenia, leucopenia en sangre periférica, leucemia mielógena aguda y linfoma.
Green et al.	1981	Ratón	3-15 600 ppm, 6 h/día x 1 semana	Granulocitopenia, linfopenia, disminución en la concentración de células tallo pluripotentes en bazo y médula.
Toft et al.	1982	Ratón	70 ppm, 6 h/día x 1 - 4 días	Reducción en la concentración de linfocitos en sangre periférica.
Baarson et al.	1984	Ratón	32 ppm, 6 h/día x 25.5 semanas	Disminución del número de células nucleadas del bazo, médula ósea femoral y linfocitos en sangre periférica.
Ward et al.	1985	Ratón	3-960 ppm, 6 h/día; 5 días/sem x 13 semanas	Disminución en la concentración de eritrocitos, plaquetas, leucocitos, hematocrito en sangre periférica, hipoplasia medular, esplénica y tímica.
Cronkite et al.	1985	Ratón	32-1280 ppm, 6 h/día; 5 días/sem x 1 semana	Hipocelularidad de la médula ósea femoral con disminución de la célula tallo pluripotente (stem) a dosis >320 ppm.
Erexson et al.	1986	Ratón	32, 320 y 3200 ppm, 6 h/día x 1 día	Disminución en el recuento de linfocitos en sangre periférica.
Farris et al.	1997	Ratón	10, 100 y 200 ppm, 6h/día; 5 días/sem x 8 semanas	Reducción en la concentración de linfocitos B en médula ósea y bazo.

Tabla 3. Efectos de la administración de benceno por vía inhalatoria en ratón
(Fuente: American Petroleum Institute (A.P.I.) 1977 Editor Sidney Laskin, 1977;
International Program on Chemical Safety (I.P.C. 1993).

Autor	Año	Especie	Dosis y tiempo de tratamiento	Resultados reportados
Koike et al.	1959	Rata	1 mL/Kg peso vía subcutánea/día x 5 semanas o 2 mL/Kg peso /día x 3 semanas	Caida rápida en la concentración de células nucleadas de médula ósea femoral, disminución de la síntesis de DNA en células mieloides.
Gerarde et al.	1956	Rata	1 mL/Kg peso via subcutánea/día x 14 días	Leucopenia con cambios no significativos en el hematocrito.
Gerarde & Ahlstrom	1966	Rata	1 mL/Kg peso vía subcutánea/día x 14 días	Leucopenia moderada.
Matsushita et al.	1966	Rata	2 mL/Kg peso vía subcutánea/día dosis única	Inhibición de la mitosis en estado de metafase y daño cromosómico en células de sangre periférica.
Dobrokholov et al.	1972	Rata	1.5 mL/Kg peso vía subcutánea/día x 12 días	Alteraciones cromosómicas (aberraciones cromosómicas) en células de médula ósea femoral
Wolf et al.	1956	Rata	1mg/Kg peso vía oral/día x 8 meses	Leucopenia ligera, en sangre periférica, esplénica y degeneración testicular
Kimura et al.	1976	Rata	3000 mg/Kg peso vía oral (dosis única)	Evaluación de la dosis media tetal LD 50
Scheding et al.	1991	Rata	150 mg/Kg peso vía oral/día x 56 y 112 días	Daños reversibles e irreversibles respectivamente en las poblaciones de granulocitos en sangre periférica y médula ósea femoral

Tabla 4. Efectos de la administración de benceno por vía subcutánea y oral en rata

(Fuente: American Petroleum Institute (A.P.I.) 1977 Editor Sidney Laskin, 1977;

International Program on Chemical Safety (I.P.C. 1993).

Autor	Año	Especie	Dosis y tiempo de tratamiento	Resultados reportados
Lignac et al.	1932	Ratón	0.1 mL/Kg peso vía subcutánea/día x 17-21 semanas	Desarrollo de linfoblastomas
Watanabe et al.	1970	Ratón	3 mL/Kg peso vía subcutánea/día x 4 semanas	Disminución en la concentración de células nucleadas de médula ósea femoral.
Lee et al..	1974	Ratón	440-2220 mg/Kg peso vía subcutánea/día dosis única	Disminución de los leucocitos totales en sangre periférica, disminución en la tasa de incorporación y utilización de ⁵⁹ Fe después de 48 horas de la administración de benceno.
Tunek et al.	1981	Ratón	7mg/Kg peso vía subcutánea/Kg peso/día x 6 días	Reducción en la celularidad medular femoral y unidades formadoras de colonias.
Siou et al.	1981	Ratón	2200 mg/Kg peso vía oral/día x 2 días	Alteraciones en células nucleadas de médula ósea femoral
Zhurkov et al.	1983	Ratón	80 mg/Kg peso vía oral/día x 2 días	Disminución en la concentración de células nucleadas de médula ósea femoral

Tabla 5. Efectos de la administración de benceno por vía subcutánea y oral en ratón (Fuente: American Petroleum Institute (A.P.I.) 1977 Editor Sidney Laskin, 1977; International Program on Chemical Safety (I.P.C. 1993).

Debe hacerse notar que aunque las vías del metabolismo de benceno parezcan cualitativamente similares en las diferentes especies estudiadas, esto no es así, existen diferencias cuantitativas en la fracción de las diferentes vías del metabolismo del benceno. Dichas diferencias entre especies llegan a ser importantes cuando se desea realizar un ensayo de riesgo a partir de datos obtenidos en animales. En estudios realizados en laboratorio, basados en el balance de masas, empleando benceno marcado radiactivamente, se observó que el ratón en comparación con la rata y los primates tienen una gran capacidad para metabolizar el benceno, produciendo principalmente metabolitos de hidroquinonas y ácido mucónico a bajas dosis de este solvente, lo que podría explicar porque el ratón resulta ser más susceptible al benceno que la rata (Tabla 5).

PARAMETRO	VALOR	
	RATA	RATON
FISIOLOGICO		
Ventilación alveolar L/hr x Kg ^a	32.400	55.30
Frecuencia cardiaca L/hr x Kg ^b	19.400	34.80
Transferencia cutánea, fracción/hr	0.2500	3.000
Peso corporal, Kg	0.2880	0.030
Flujo sanguíneo (fracción de la frecuencia cardiaca) ^b		
Al hígado		0.25
A la grasa		0.09
A los tejidos pobremente perfundidos ^c		0.15
A los tejidos ricamente perfundidos ^d		0.51
Volumen de órganos (fracción del peso corporal) ^e		
Sangre		0.056
Hígado		0.03
Grasa		0.11
Tejido pobremente perfundido		0.74
Tejido ricamente perfundido		0.06
Químico		
Peso molecular g / mole		78.2
Coefficientes de partición ^f		
Hígado/sangre		1.0
Grasa/sangre		28.0
Tejidos pobremente perfundidos/sangre		0.6
Tejidos ricamente perfundidos/sangre		1.0
Sangre/aire		18.0
Parámetros bioquímicos^g		
Vmax umole/hr x Kg	122.0	200.0
Km umole/L	40.00	1.000
Vmax pcm umole/hr x Kg	174.0	333.0
Km phc umole/L	5.000	3.000
Vmax pmc umole/hr x Kg	104.0	90.00
Km pmc umole/L	15.00	4.000
Vmax hqc umole/Hg x Kg	1.700	27.00
Parámetros bioquímicos^g		
Km hqc umole/L	0.500	0.100
Vmax muc umole/hr x Kg	3.500	12.00
Km umole/L	0.500	0.100

Tabla 6. Parámetros usualmente evaluados en modelos de simulación fisiológica para el metabolismo del benceno en rata y ratón. ^aDeterminados experimentalmente (Sabourin *et al.* 1987); ^bDatos de Ramsey & Anderson (1984); ^cSe incluye hueso, piel y músculo; ^dSe incluye riñón, corazón, hígado, cerebro, bazo, intestinos y médula ósea ^eDatos de Dutcher *et al.* (1985) y Birnbaum *et al.* (1980); ^fDatos de Thomas (1986); ^gEn relación a la figura 2. En: Medinsky *et al.* 1989.

No existe actualmente un esquema de inducción de anemia aplásica en animales de laboratorio con benceno por vía subcutánea debido a que se emplea con mayor frecuencia la vía de exposición inhalatoria, ya que la inhalación de los vapores de este solvente es la principal fuente de contacto en el hombre, en el medio ambiente y el ámbito laboral. Sin embargo, las dosis y tiempos de exposición a los vapores de este solvente en rata y ratón difieren mucho entre sí, además de involucrar el empleo de equipo costoso para mantener atmósferas con saturación constante de benceno por periodos prolongados, lo que hace poco práctico el empleo de esta vía. Por tal motivo, es necesario establecer un modelo de inducción de anemia aplásica a corto plazo con benceno por vía subcutánea en rata y ratón que elimine el empleo de equipo costoso y reduzca el tiempo de exposición a este solvente, permitiendo además su utilización en el estudio de las diferentes etapas de esta enfermedad, así como el ensayo de tratamientos alternativos como el trasplante de células tallo pluripotentes (stem) electrofusionadas o bien extractos obtenidos de plantas reportadas en México como medicinales en el manejo de afecciones hematológicas.

HIPÓTESIS.

El benceno es asociado con alteraciones hematológicas en el hombre como resultado de la inhalación de los vapores y la absorción cutánea de éste solvente; por tal razón es posible generar un esquema reproducible de hematotoxicidad que derive en un cuadro de anemia aplásica al administrar benceno por vía subcutánea en rata y ratón, que sea comparable a los resultados reportados para la inhalación de éste solvente, permitiendo así el estudio del curso de éste padecimiento bajo condiciones controladas.

OBJETIVO GENERAL.

Establecer un modelo reproducible de inducción de anemia aplásica con benceno por vía subcutánea en rata y ratón que permita su utilización en el estudio de los diferentes estadios de este padecimiento.

OBJETIVOS PARTICULARES.

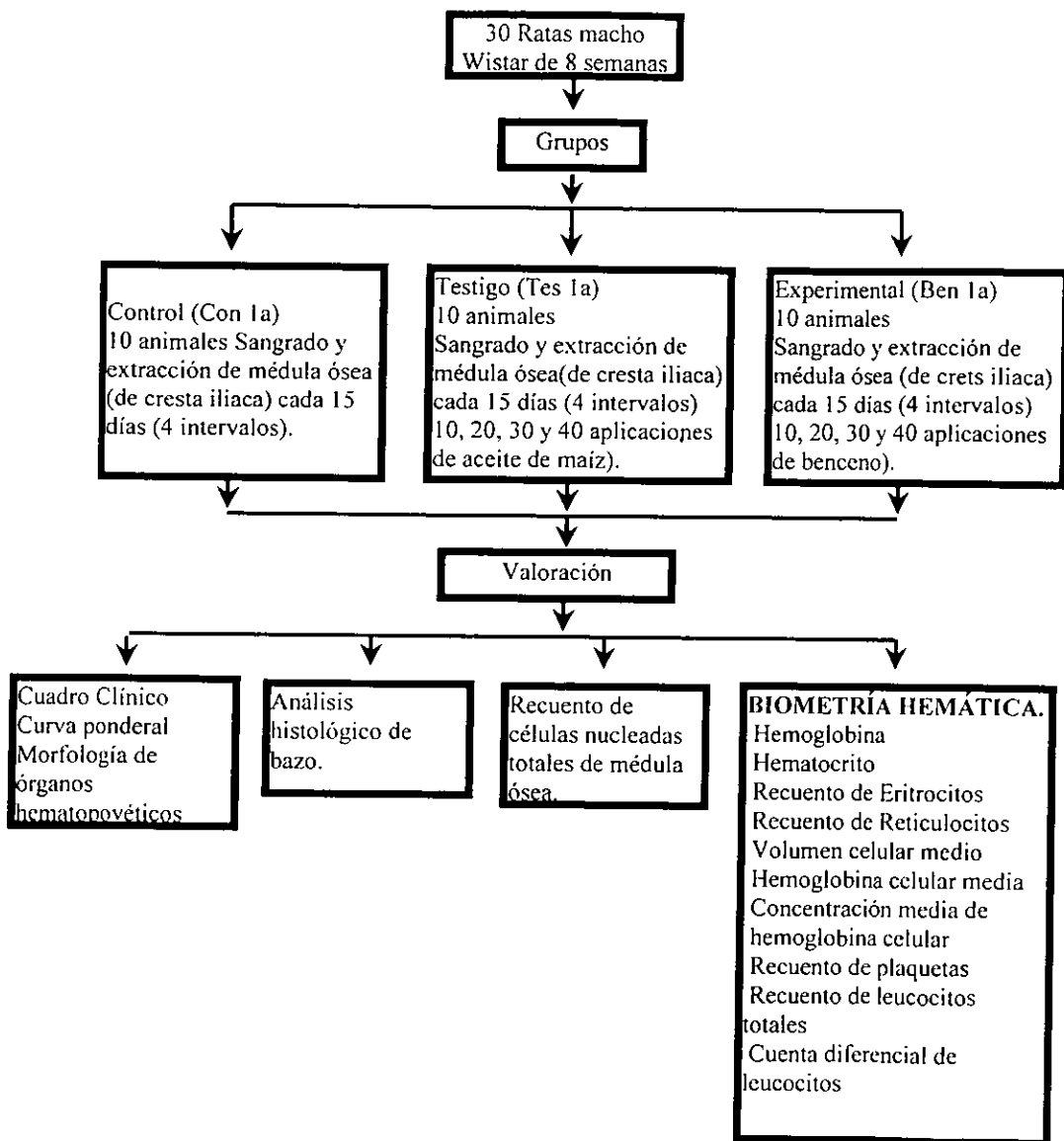
Establecer la dosis y tiempo de administración de benceno por vía subcutánea adecuados para inducir anemia aplásica en rata y ratón.

Determinar el efecto de la administración de benceno por vía subcutánea en sangre periférica, médula ósea y bazo de rata y ratón a lo largo del tiempo de tratamiento.

Comparar entre las especies utilizadas las alteraciones ocasionadas en sangre periférica, médula ósea y bazo por la administración de benceno por vía subcutánea.

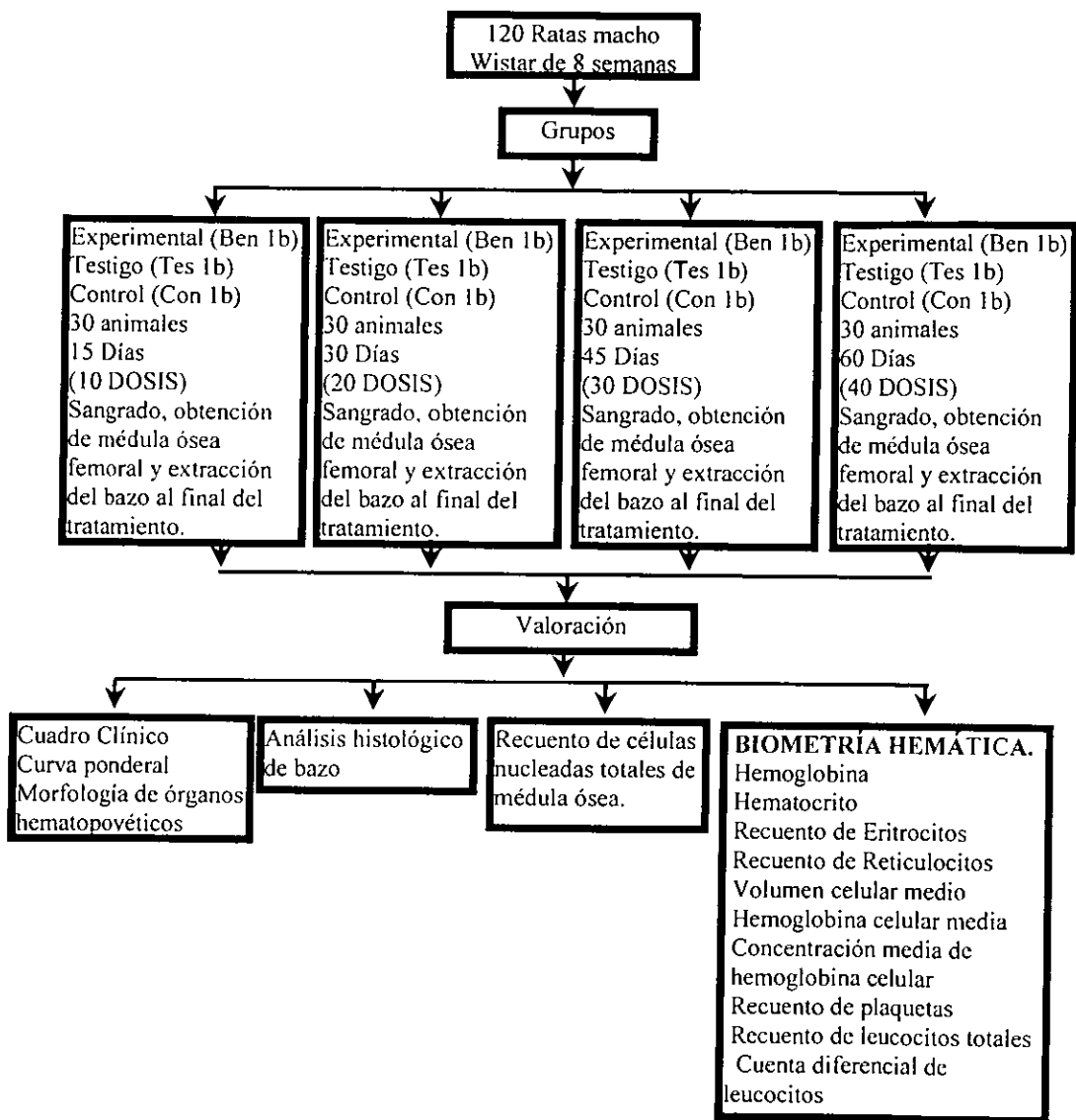
Evaluar la eficiencia de los esquemas de inducción de anemia aplásica con benceno por vía subcutánea ensayados en rata y ratón.

DISEÑO EXPERIMENTAL
INDUCCIÓN DE ANEMIA APLÁSTICA EN RATA (ESQUEMA 1a)



Control: Sin tratamiento (Con 1a)
 Testigo: 2 mL aceite de maíz/Kg peso (Tes 1a)
 Experimental: 2 mL benceno (50% v/v) en aceite de maíz/Kg peso (Ben 1a)

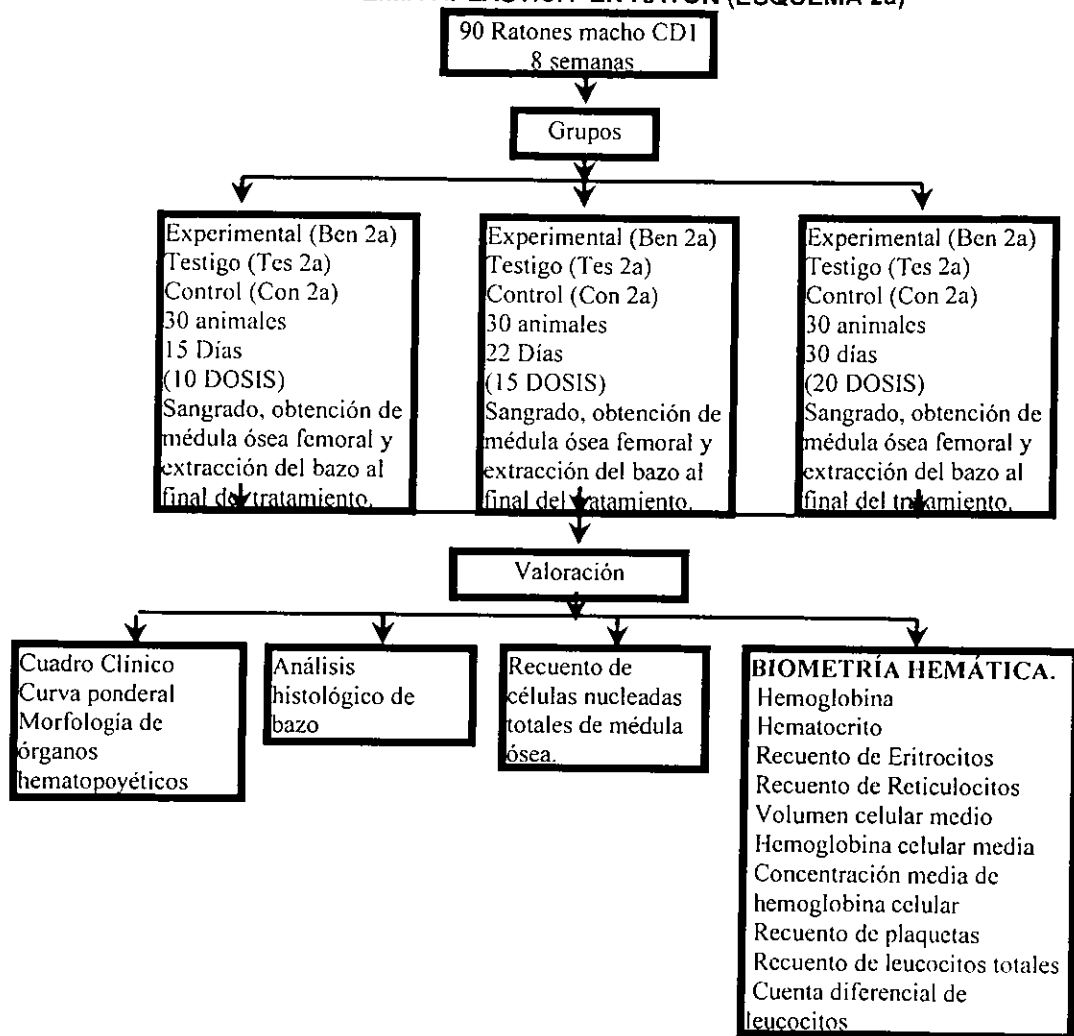
DISEÑO EXPERIMENTAL
INDUCCIÓN DE ANEMIA APLÁSTICA EN RATA (ESQUEMA 1b)



Control: Sin tratamiento (Con 1b)
 Testigo: 2 mL aceite de maíz/Kg peso (Tes 1b)
 Experimental: 2 mL benceno (50% v/v) en aceite de maíz/Kg peso (Ben 1b)

DISEÑO EXPERIMENTAL

INDUCCIÓN DE ANEMIA APLÁSTICA EN RATÓN (ESQUEMA 2a)

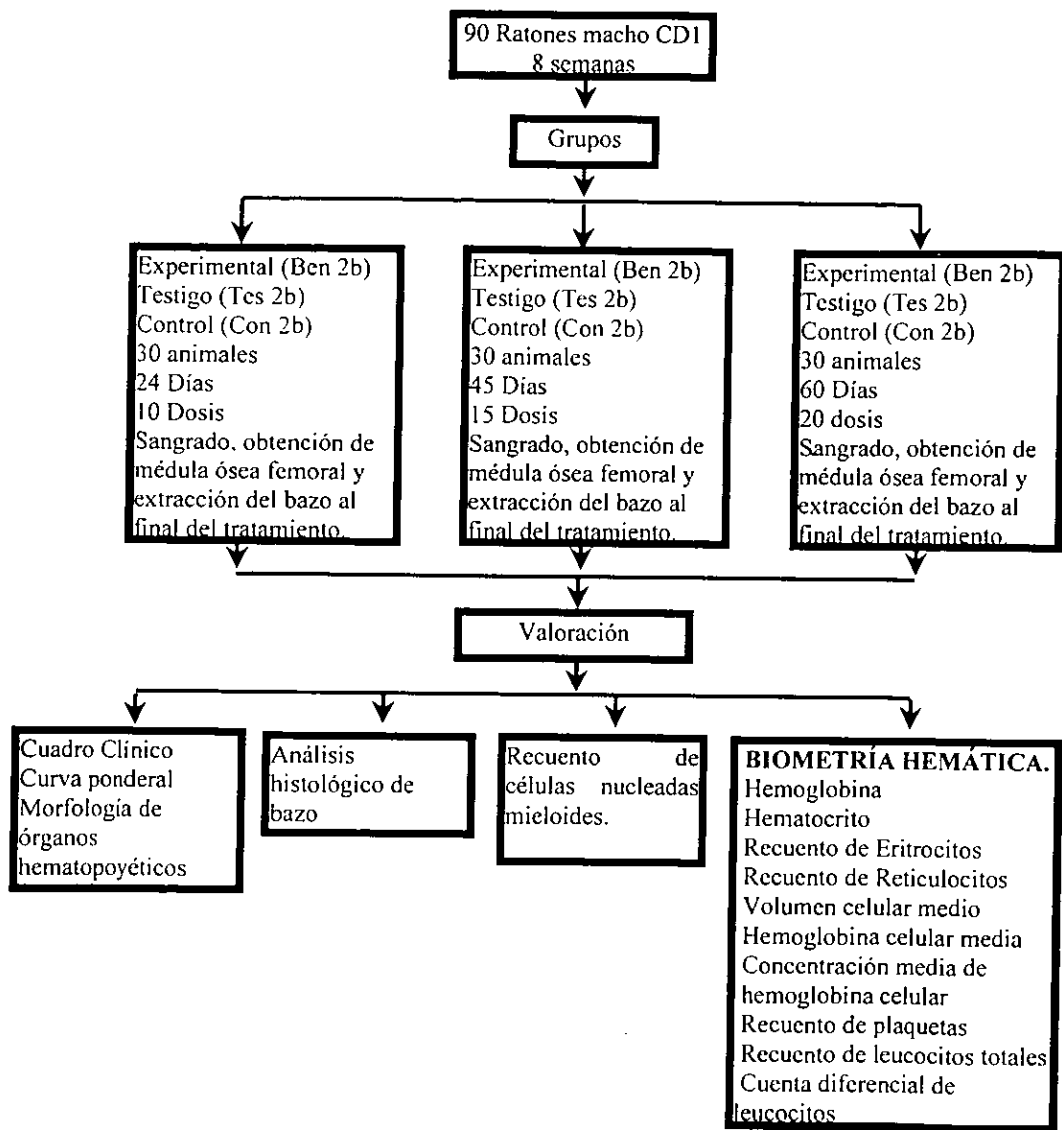


Control: Sin tratamiento (Con 1b)

Testigo: 2 mL aceite de maíz/Kg peso (Tes 1b)

Experimental: 2 mL. benceno (50% v/v) en aceite de maíz/Kg peso (Ben 1b)

DISEÑO EXPERIMENTAL
INDUCCIÓN DE ANEMIA APLÁSTICA EN RATÓN (ESQUEMA 2b)



Control: Sin tratamiento (Con 2b)
 Testigo: 2 mL aceite de maíz/Kg peso (Tes 2b)
 Experimental: 2 mL benceno (50% v/v) en aceite de maíz/Kg peso (Ben 2b)

MATERIAL Y METODOS.

El trabajo experimental se realizó en el laboratorio de Biorregulación de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la UNAM, en colaboración con el laboratorio de Hematología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa durante los meses de julio de 1997 a julio del 2000.

Se utilizaron dos especies diferentes (rata y ratón) y para cada caso se ensayaron dos esquemas de inducción de anemia aplástica (a y b) mediante la administración subcutánea de benceno respectivamente.

INDUCCIÓN EXPERIMENTAL DE ANEMIA APLÁSTICA EN RATA (Esquemas 1a y 1b).

Se emplearon 150 ratas macho cepa Wistar de 8 semanas de edad, obtenidas del bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la UNAM, los animales fueron pesados y mantenidos con ingesta libre de agua y alimento.

Esquema 1a

30 ratas fueron distribuidas en 3 grupos con 10 animales cada uno de la siguiente manera:

- 1.- Control, sin tratamiento (Con1a)
- 2.- Testigo: 2 mL de aceite de maíz/Kg de peso via subcutánea (Tes1a)
- 3.- Experimental: 2 mL de benceno (J.T. Baker) 50% v/v en aceite de maíz/Kg de peso vía subcutánea (Ben1a).

La administración de los tratamientos siguió un esquema de cinco días de aplicación (lunes a viernes) y dos de descanso (sábado y domingo) durante 8 semanas.

Dos días después del término de los diferentes periodos de inoculación a cada grupo, se observó el comportamiento de los animales, posteriormente fueron anestesiados con uretano al 17% por vía ip, se registró peso, se evaluó el cuadro clínico

de cada animal (presencia de hematomas, cianosis y lesiones cutáneas); se obtuvo la sangre por punción cardíaca y fue recibida con 0.1 mL de Heparina por cada mililitro de sangre (1000 UI/mL; Eli Lilly and Co.); se realizó biometría hemática completa. Los animales fueron revisados para determinar la presencia de lesiones aparentes. La médula ósea (exclusivamente para este esquema) fue obtenida por punción de la cresta iliaca con agujas y jeringas heparinizadas y fue mantenida en solución salina fisiológica a 37 °C para la cuantificación de células nucleadas totales. Al completar 40 aplicaciones de tratamiento, se practicó la necropsia, el bazo fue aislado, pesado y fijado en formaldehído al 4% amortiguado con amortiguador de fosfatos (PBS pH 7.2) para su estudio histopatológico (Simmons 1980).

Biometría Hemática:

Para la cuenta de eritrocitos la sangre se diluyó 1:200 con fluido de Gower en pipeta de Thoma para glóbulos rojos. Para cuantificar leucocitos la sangre se diluyó 1:20 con solución diluyente de Turk en pipeta de Thoma para glóbulos blancos. En ambos casos las células se contaron en hemocitómetro por medio de microscopía de campo claro. Para la cuantificación de plaquetas la sangre se diluyó 1:200 con oxalato de amonio al 1% y se realizó conteo en microscopía por contraste de fases (Simmons 1980)⁴².

Se prepararon extendidos que fueron teñidos con colorante de Wright y con Nuevo Azul de Metileno para la cuantificación diferencial de leucocitos y reticulocitos respectivamente (Williams *et al.* 1991)²³.

La hemoglobina se cuantificó por espectrofotometría por el método de la cianometahemoglobina y el hematocrito se obtuvo por centrifugación en capilar (Williams *et al.* 1991)²³; por medio de los valores de la concentración de eritrocitos, la hemoglobina total y el hematocrito, se obtuvieron los índices eritrocitarios.

- Hemoglobina Celular Media (H.C.M.).

$$\text{H.C.M.} = \frac{\text{Hemoglobina (g/100 mL)} \times 10}{\text{Cuenta de eritrocitos (} \times 10^3/\text{mm}^3\text{)}}$$

Expresada en picogramos (pg).

- Volumen Celular Medio (V.C.M.).

$$\text{V.C.M.} = \frac{\text{Hematocrito (\%)} \times 10}{\text{Cuenta de eritrocitos (} \times 10^3/\text{mm}^3\text{)}}$$

Expresado en fentolitros (fL) o micrómetros cúbicos (μm^3)

- Concentración Media de Hemoglobina Celular (C.M.H.C.).

$$\text{C.M.H.C.} = \frac{\text{Hemoglobina (g/100 mL)} \times 10}{\text{Hematocrito}}$$

Expresada en porcentaje (%).

Cuantificación de células mieloides totales.

Para el recuento de células nucleadas totales de la médula ósea en este esquema, se obtuvo 0.1 mL de médula ósea de la cresta ilíaca, se adicionó 1 mL de solución salina fisiológica, la suspensión celular se diluyó 1:20 con diluyente de Turk y en pipeta de Thoma para glóbulos blancos y se cuantificaron en hemocitómetro mediante microscopía de campo claro (Nakeff 1976)⁴⁴. Asimismo, para la cuenta diferencial, se realizaron extendidos de médula ósea los cuales fueron teñidos con colorante Giemsa y observados a inmersión.

Histopatología del bazo.

Al término de los 60 días de tratamiento, el bazo fue disecado, pesado y colocado en solución fijadora de Bouin, se lavó en etanol al 70% y deshidrató con una serie de alcoholes graduales al 80%(dos veces de 60 minutos cada una), 96% (dos veces de 60 minutos cada una) y 100% (dos veces de 60 minutos cada una) respectivamente, se aclaró con una mezcla 1:1 de etanol 100% - xileno (durante 60 minutos) y dos pasos de xileno absoluto (60 minutos cada uno). La inclusión se realizó con parafina. De cada órgano fueron obtenidos cortes seriados de 7 micrómetros (en plano sagital) que se tiñeron con la técnica de hematoxilina-eosina (Humason 1979), fueron observados al microscopio óptico con objetivos 100x y en analizador de imágenes.

Esquema 1b

En el segundo esquema se emplearon 120 ratas distribuidas en cuatro lotes de treinta animales cada uno: tratados durante 8 semanas hasta completar 10, 20, 30 y 40 aplicaciones. Cada lote fue subdividido en tres grupos con 10 animales de la siguiente manera:

- 1.- Control, sin tratamiento (Con 1b)
- 2.- Testigo: 1 mL de aceite de maíz/Kg de peso vía subcutánea (Tes 1b)
- 3.- Experimental: 2 mL de benceno (J.T. Baker) 50% v/v en aceite de maíz/Kg de peso vía subcutánea (Ben 1b).

La administración de los tratamientos siguió un esquema de cinco días de aplicación (lunes a viernes) y dos de descanso (sábado y domingo) durante 8 semanas.

Dos días después de la última inoculación de cada grupo los animales fueron evaluados con los mismos parámetros clínicos que para el esquema 1a, posteriormente fueron anestesiados con uretano al 17% por vía IP, se registro peso corporal, se obtuvo la sangre por punción cardíaca, la sangre fue recibida en tubos con heparina y se realizó una biometría hemática completa. Se sacrificó a los animales por fraccionamiento cervical y realizó necropsia, se examinó la apariencia macroscópica de los órganos internos, se disectó el bazo y se fijo en solución fijadora de Bouin para su procesamiento histológico de rutina, también se disecó el fémur derecho para la cuantificación de células nucleadas totales de la médula ósea. Las cuantificaciones y procedimientos se realizaron siguiendo los protocolos usados para el esquema a.

INDUCCIÓN EXPERIMENTAL DE ANEMIA APLÁSTICA EN RATÓN (esquemas 2a y 2b)

Se utilizaron 180 ratones macho cepa CD1, de 8 a 12 semanas de edad, obtenidos del bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la UNAM, los animales fueron pesados y mantenidos con ingesta libre de agua y alimento y fueron colocados en grupos de cinco por jaula. Se utilizaron dos esquemas de tratamiento con benceno (J.T. Baker) 2ml/kg diluido al 50% en aceite de maíz.

Esquema 1b

90 ratones fueron distribuidos en tres lotes de 30 cada uno: Control, sin tratamiento (Con 2a), Testigo (aceite de maíz vía sc); (Tes 2a); Benceno (benceno+aceite de maíz vía SC); (Ben 2a). Cada lote fue subdividido en tres grupos de 10 animales, el tratamiento se administró diariamente de lunes a viernes a cada grupo, hasta completar 10, 15 y 20 dosis (15,22 y 29 días) respectivamente.

Esquema 2b

En el segundo esquema se emplearon 90 ratones que fueron distribuidos de la misma manera que para el esquema 1, Control, sin tratamiento (Con 2b), Testigo (aceite de maíz vía SC); (Tes 2b); Benceno (benceno + aceite de maíz vía SC); (Ben 2b) se administró el benceno cada tercer día con dos días de descanso hasta completar las 10, 15 y 20 dosis respectivamente.

Para ambos esquemas, dos días después de la última inoculación de cada grupo, se evaluaron los mismos parámetros que para los esquemas 1a y 1b de rata.

Las dosis de benceno propuestas para los diferentes esquemas de inducción de Anemia Aplástica en rata y ratón respectivamente, se calcularon en base a las concentraciones reportadas con mayor frecuencia en trabajos previos y sus equivalentes en dosis inhaladas (Goldstein & Witz 1992; Farris 1997; Snyder *et al.* 1978; Snyder *et al.* 1980; Meidnsky *et al.* 1989).

Para los diferentes esquemas, los resultados obtenidos están expresados como la media aritmética, la desviación estándar y la comparación de medias para pares de datos no agrupados. Para determinar la significancia estadística de los resultados, se aplicaron las pruebas de ANOVA multivariada (R de Rao) y LSD de Fisher (Daniel 1983).

RESULTADOS:

INDUCCIÓN EXPERIMENTAL DE ANEMIA APLÁSTICA EN RATA (Esquemas 1a y 1b).

Esquema 1a

Los animales del grupo benceno (Ben 1a), mostraron adinamia, irritabilidad, hematomas y cianosis en las extremidades principalmente; se observó reducción del 33% en el peso corporal al final del experimento con relación a los grupos testigo 1a y control 1a (Tabla 7), en la zona de aplicación del benceno se observó también: alopecia y lesiones cutáneas moderadas (úlceraciones).

En el examen postmortem (realizado al final de las 40 aplicaciones de tratamiento) no se observaron alteraciones en órganos internos; con excepción del bazo de los animales del grupo Ben 1a que presentó una reducción significativa en tamaño y peso (70%) con relación a los grupos control y testigo; no se apreciaron alteraciones en su consistencia, textura y coloración característica (Tabla 7).

Biometría hemática.

En el grupo que recibió benceno se observó disminución en el recuento de eritrocitos (8.12%) al momento de realizar el análisis al haber transcurrido diez administraciones de benceno, la cual se acentuó (17.90%) en el transcurso del tratamiento hasta alcanzar 20 administraciones, finalizando con una disminución del 38.75% (con referencia a sus respectivos testigos y control) al acumular 40 administraciones ($P < 0.001$) Gráfica 1; asimismo, se observaron alteraciones morfológicas diversas en estas células como: anisocitosis, crenocitosis y poiquilocitosis.

La concentración de hemoglobina se redujo significativamente (28.12%) desde la 10a aplicación del benceno y se mantuvo decreciente hasta alcanzar las 40 aplicaciones (56.47%) Tabla 8.

En el grupo Ben 1a el hematocrito se mantuvo constante con relación a sus respectivos testigo y control. El volumen celular medio (VCM) de los eritrocitos en este grupo se incrementó en el curso del tratamiento (48.16%), lo que ocasiona que tanto valores de concentración media de hemoglobina (CMH) y de concentración celular media de hemoglobina (CMHC) muestren variaciones (28.98 y 52.19% respectivamente) con significancia estadística al acumular 40 administraciones de benceno (Tabla 8).

El valor promedio final del porcentaje de reticulocitos en ratas tratadas con benceno (Ben 1a) fue 5 veces mayor con respecto a los grupos testigo y control ($P < 0.001$) Tabla 8.

La concentración de plaquetas mostró desde las primeras 10 administraciones una disminución significativa ($P < 0.001$) del 33.12%; lá cual se mantuvo a la baja de tal modo que al completar 40 aplicaciones la disminución final fue de 46.81% con relación a los grupos testigo y control (Gráfica 2).

La concentración de Leucocitos presentó una baja significativa ($P < 0.001$) proporcional al número de dosis recibidas (55.63% menor respecto al valor de los grupos testigo y control al final del experimento) Gráfica 3.

En las ratas tratadas con benceno se apreció disminución significativa en el porcentaje de linfocitos e incremento en la cuenta de neutrófilos, monocitos y eosinófilos (Gráfica 4C).

Cuantificación de células mieloides totales.

En este parámetro, se pudo apreciar disminución de la concentración de células mieloides totales desde la décima administración de benceno (71.14% respecto a los grupos testigo y control al final del experimento) Gráfica 6.

Histopatología del bazo.

La apariencia macroscópica del bazo permaneció normal (consistencia, textura y color), no así su peso y tamaño (que disminuyeron). Al realizar el estudio histopatológico, no se observó alteración de la cápsula de Bowman; no obstante, las trabéculas que

penetran al parénquima esplénico presentaron un desarreglo (característico que acompaña ciertas patologías del bazo), la pulpa blanca presentó desarreglo en su organización como consecuencia del tratamiento. La zona marginal nodular se observó difusa, además en la pulpa roja se apreciaron zonas con abundancia de células candidatas a Megacariocitos (Figura 9C) en comparación al grupo control (Figuras 15 A y 15 B).

Esquema 1b

Las ratas tratadas con benceno (Ben 1b) presentaron en menor grado los mismos signos clínicos aparentes que las ratas tratadas con benceno del esquema 1 (Ben 1a).

En el examen posmortem, se encontró también reducción importante de la masa esplénica en tamaño y peso (62.87%) Tabla 7; no se observó necrosis ni cambios en la apariencia del órgano.

Biometría hemática.

Al completar la dosis 20 en las ratas tratadas con benceno (Ben 1b) se observó una disminución significativa ($P < 0.001$) del 44% en la concentración de eritrocitos, la cual se incrementó hasta alcanzar un valor de 66% al completar 40 aplicaciones de benceno (Gráfica 1). Al igual que para el esquema 1a, se observaron alteraciones morfológicas diversas en estas células como: anisocitosis, crenocitosis y poiquilocitosis.

En este grupo se observó una disminución significativa ($P < 0.001$) de la concentración de hemoglobina (30%) a las 10 dosis acentuándose en relación directa con el número de dosis administradas. La concentración al final del experimento representó el 57.36% con relación a sus respectivos control y testigo (Tabla 8).

El hematocrito no mostró diferencia entre las ratas tratadas con benceno de los diferentes lotes con relación a sus respectivos controles y testigos (Tabla 8).

En este grupo (Ben 1b) se observó un incremento (35.55%) en el volumen celular medio (VCM) de los eritrocitos de las ratas al recibir 40 aplicaciones de benceno. Se

apreciaron variaciones significativas ($P < 0.001$) en los valores de hemoglobina celular media (disminución de 30.38% al acumular 40 aplicaciones de benceno) y la concentración media de hemoglobina celular (53.71%) con relación a sus respectivos control y testigo, Tabla 8.

Así mismo, la concentración de reticulocitos mostró un aumento 30 veces mayor en los animales que recibieron benceno en comparación con los grupos testigo y control, Tabla 8.

La concentración de plaquetas disminuyó significativamente ($P < 0.001$) a partir de las 10 aplicaciones de benceno (31%) y se acentuó al acumular 40 aplicaciones de benceno (66%), Gráfica 2.

Se observó disminución en la concentración de leucocitos a partir de las 10 aplicaciones de benceno (33%) para alcanzar una disminución final del 73% con respecto a los animales de los grupos control y testigo, Gráfica 3.

En las ratas tratadas con benceno se observó una disminución en la concentración de linfocitos a partir de las 10 aplicaciones que se mantuvo hasta las 30 aplicaciones, en este periodo aumentó la concentración de neutrófilos, monocitos y eosinófilos, (Gráfica 5C), no obstante, al completar las 40 aplicaciones del benceno se observó un repunte que no alcanzó la concentración inicial y la concentración de neutrófilos regreso a su concentración normal.

Cuantificación de células mieloides totales.

Se puede apreciar disminución de la concentración de células mieloides totales desde la décima aplicación (53.73% respecto a los grupos control y testigo) resultando en una disminución final del 70% ($P < 0.001$), Gráfica 6.

Histopatología del bazo.

Al igual que para el primer esquema, en los animales que recibieron benceno, no se observaron alteraciones macroscópicas (consistencia, textura y color) del bazo, aunque se registró una disminución del tamaño y peso del órgano. En el estudio

histopatológico se observó un adelgazamiento de la cápsula de Bowman, la organización de la pulpa roja se observó ligeramente alterada y se encontraron gran cantidad de megacariocitos en comparación con los bazos de las ratas de los grupos control y testigo. La pulpa blanca presentó desarreglo en su organización; la zona marginal nodular se observó difusa, en tanto que en el centro germinativo se apreciaron focos necróticos. (Figura 16 B y 16 C).

INDUCCIÓN EXPERIMENTAL DE ANEMIA APLÁSTICA EN RATA (Esquemas 1a y 1b)

PESO CORPORAL Y ESPLÉNICO

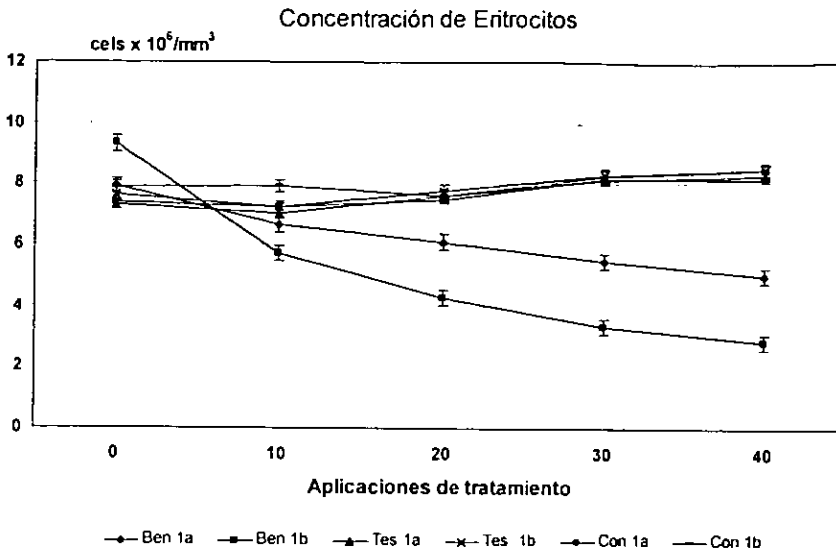
PESO CORPORAL	APLICACIONES	CONTROL 1a	TESTIGO 1a	BENCENO 1a	CONTROL 1b	TESTIGO 1b	BENCENO 1b
g	10	243.0 +/- 18.80	235.0 +/- 11.80	173.3 +/- 17.70*	245.8 +/- 18.95	238.5 +/- 15.9	180.6 +/- 19.9
	20	286.0 +/- 11.70	283.3 +/- 15.41	211.6 +/- 10.60*	295.8 +/- 17.15	290.5 +/- 18.6	215.9 +/- 18.1*
	30	330.7 +/- 13.78	321.6 +/- 19.15	235.0 +/- 16.43*	335.6 +/- 18.73	315.9 +/- 12.6	246.8 +/- 19.5*
	40	353.3 +/- 16.6	356.3 +/- 14.70	236.6 +/- 25.00*	350.8 +/- 18.8	365.9 +/- 19.2	250.9 +/- 13.8*
PESO ESPLÉNICO	10				1.227 +/- 0.15	1.129 +/- 0.10	0.921 +/- 0.12
	20				1.470 +/- 0.15	1.304 +/- 0.11	0.853 +/- 0.09*
	30				1.679 +/- 0.21	1.723 +/- 0.15	0.703 +/- 0.05*
	40	1.887 +/- 0.35	1.988 +/- 0.33	0.564 +/- 0.08*	1.778 +/- 0.22	1.844 +/- 0.22	0.660 +/- 0.03*

Tabla 7. Peso corporal y esplénico de ratas tratadas con benceno y sus respectivos controles y testigos. Los datos se expresan como valores promedio +/- error estándar (n = 10). *Significancia estadística (P < 0.001) con respecto al testigo y control.

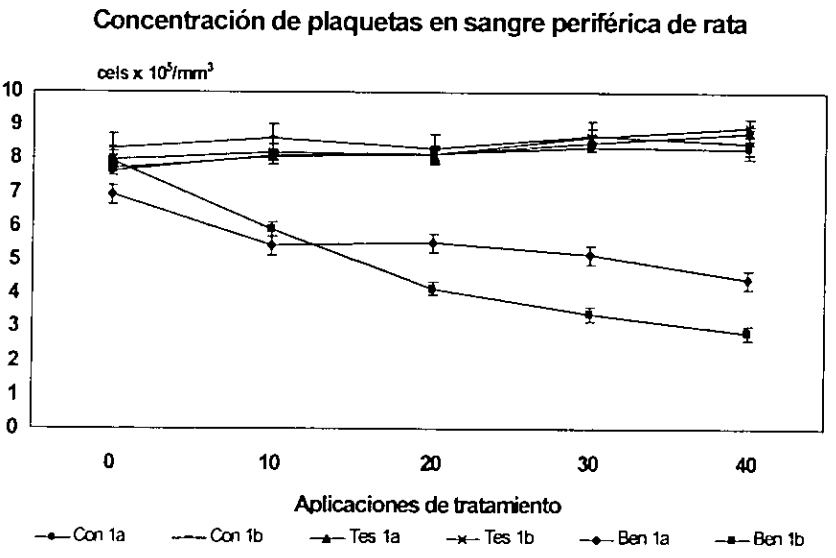
PARÁMETROS ERITROIDES

PARAMETRO	APLICACIONES	CONTROL1a	TESTIGO1a	BENCENO1a	CONTROL1b	TESTIGO1b	BENCENO1b
HEMOGLOBINA g/dL	0	17.90 +/- 0.71	17.82 +/- 0.43	13.97 +/- 0.30	18.57 +/- 0.58	18.49 +/- 0.43	13.9 +/- 0.30
	10	19.31 +/- 0.65	19.34 +/- 0.79	13.88 +/- 0.26	19.81 +/- 0.46	19.67 +/- 0.48	13.9 +/- 0.27
	20	21.44 +/- 0.49	20.83 +/- 0.24	10.98 +/- 0.56*	20.61 +/- 0.42	20.99 +/- 0.28	10.9 +/- 0.56*
	30	20.55 +/- 0.41	20.87 +/- 0.51	9.63 +/- 0.63*	20.55 +/- 0.41	20.86 +/- 0.51	9.96 +/- 0.44*
	40	28.86 +/- 0.44	20.47 +/- 0.18	9.08 +/- 0.42*	21.20 +/- .037	20.81 +/- 0.41	9.04 +/- 0.44*
HEMATOCRITO %	0	38.20 +/- 2.49	54.57 +/- 2.04	40.87 +/- 3.57	39.54 +/- 2.00	56.23 +/- 1.68	42.50 +/- 2.65
	10	53.95 +/- 1.23	49.78 +/- 1.43	45.23 +/- 1.29	53.41 +/- 1.12	49.61 +/- 1.45	45.23 +/- 1.30
	20	53.31 +/- 1.22	53.86 +/- 1.01	48.31 +/- 1.58	53.81 +/- 1.05	53.86 +/- 1.01	48.30 +/- 1.59
	30	51.29 +/- 1.41	49.22 +/- 1.65	52.77 +/- 2.11	51.29 +/- 1.41	49.61 +/- 1.53	51.10 +/- 0.70
	40	52.52 +/- 0.70	50.46 +/- 0.32	49.61 +/- 1.21	53.52 +/- 1.51	50.63 +/- 0.25	49.29 +/- 1.09
VOLUMEN CELULAR MEDIO (V.C.M.) fL	0	51.84 +/- 4.14	74.73 +/- 2.57	53.36 +/- 6.59	50.68 +/- 3.38	76.47 +/- 1.99	55.03 +/- 5.78
	10	62.48 +/- 3.03	70.96 +/- 2.52	68.46 +/- 3.96	75.22 +/- 1.99	72.62 +/- 2.37	69.46 +/- 4.29
	20	71.73 +/- 1.78	72.35 +/- 1.39	79.88 +/- 4.41	72.56 +/- 1.30	72.68 +/- 1.30	79.88 +/- 4.40
	30	74.42 +/- 1.69	60.39 +/- 2.14	96.64 +/- 5.19*	62.48 +/- 3.07	62.05 +/- 2.06	49.29 +/- 1.09
	40	51.84 +/- 4.14	60.65 +/- 0.97	100.6 +/- 6.81*	64.83 +/- 1.06	50.63 +/- 0.25	100.6 +/- 6.81*
HEMOGLOBINA CELULAR MEDIA (H.C.M.) pg	0	24.15 +/- 0.7	24.22 +/- 1.04	24.18 +/- 6.60	24.15 +/- 0.77	25.38 +/- 0.92	17.80 +/- 1.08
	10	26.64 +/- 0.7	27.67 +/- 1.56	21.04 +/- 1.21	27.29 +/- 0.66	27.67 +/- 1.56	20.37 +/- 0.60
	20	27.50 +/- 0.76	27.52 +/- 0.88	18.23 +/- 1.54*	27.83 +/- 0.60	29.70 +/- 1.41	18.23 +/- 1.54
	30	25.33 +/- 0.44	25.63 +/- 0.88	17.69 +/- 0.81*	25.33 +/- 0.44	26.63 +/- 1.12	17.69 +/- 0.81
	40	25.46 +/- 0.52	24.31 +/- 0.53	18.08 +/- 0.91*	25.97 +/- 0.61	24.97 +/- 0.53	18.08 +/- 0.98
CONCENTRACIÓN MEDIA DE HEMOGLOBINA CELULAR (C.M.H.C.) g/dL	0	48.27 +/- 4.65	31.14 +/- 1.50	35.66 +/- 3.50	49.94 +/- 3.87	32.81 +/- 1.60	37.32 +/- 3.08
	10	35.97 +/- 1.69	39.04 +/- 1.58	30.75 +/- 0.68	35.94 +/- 1.70	40.70 +/- 1.03	30.26 +/- 0.33
	20	38.32 +/- 0.64	38.32 +/- 0.63	22.75 +/- 1.81*	39.72 +/- 0.37	22.87 +/- 0.69	22.87 +/- 0.69
	30	40.96 +/- 1.87	40.96 +/- 1.87	18.91 +/- 1.04*	40.96 +/- 1.91	42.48 +/- 0.94	10.90 +/- 1.049*
	40	39.70 +/- 1.307	39.71 +/- 1.30	18.12 +/- 0.81*	39.21 +/- 1.50	41.27 +/- 0.96	18.15 +/- 1.79*
RETICULOCITOS %	0	.007 +/- .0008	.006 +/- .0008	.006 +/- .0008	.009 +/- .0005	.007 +/- .0008	.007 +/- .0004
	0	.006 +/- .0008	.006 +/- .0008	.009 +/- .0001	.006 +/- .0005	.006 +/- .0006	.010 +/- .0010
	20	.006 +/- .0008	.007 +/- .0004	.020 +/- .0002*	.007 +/- .0005	.007 +/- .0006	.022 +/- .0020*
	30	.006 +/- .0008	.007 +/- .0005	.037 +/- .0004*	.007 +/- .0007	.007 +/- .0006	.037 +/- .0070*
	40	.006 +/- .0004	.007 +/- .0003	.102 +/- .0210*	.006 +/- .0006	.007 +/- .0009	.202 +/- .0201*

Tabla 8. Efecto de la administración subcutánea de benceno en rata sobre los parámetros eritroides. Los datos se expresan como promedio +/- error estándar (n = 10). *Significancia estadística con respecto al testigo y control.

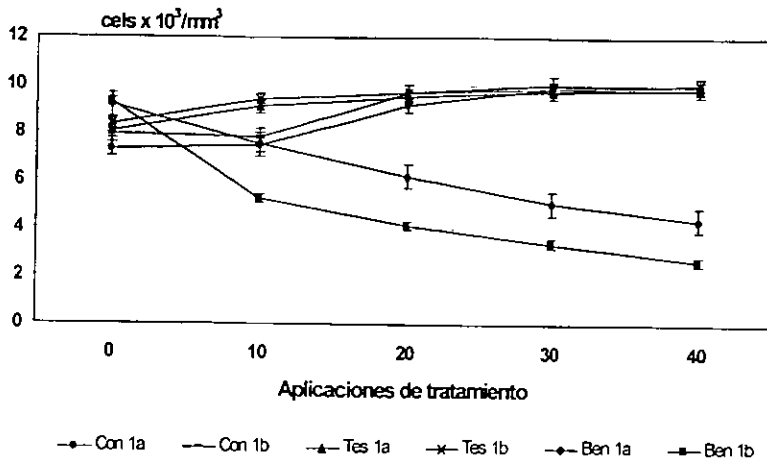


Gráfica 1. Concentración de eritrocitos en sangre periférica de ratas expuestas a benceno durante 60 días (40 aplicaciones) Ben 1a y Ben 1b y sus respectivos testigos (Tes 1a y Tes 1b) y controles (Con 1a y Con 1b). Valores Promedio +/- error estandar (n = 10).



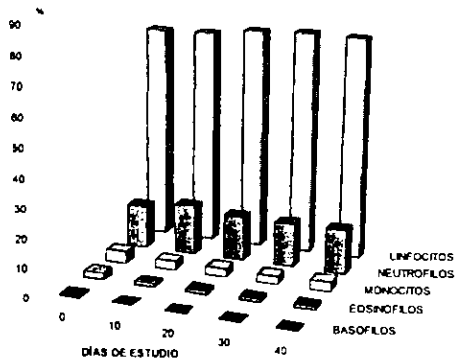
Gráfica 2. Concentración de plaquetas en sangre periférica de ratas expuestas a benceno durante 60 días (40 aplicaciones) Ben 1a y Ben 1b y sus respectivos testigos (Tes 1a y Tes 1b) y controles (Con 1a y Con 1b). Valores Promedio +/- error estandar (n = 10).

Concentración de leucocitos en sangre periférica de rata



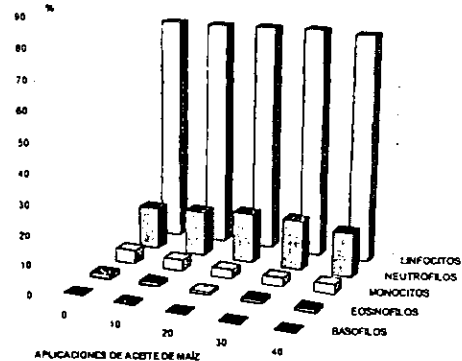
Gráfica 3. Concentración de leucocitos en sangre periférica de ratas expuestas a benceno durante 60 días (40 aplicaciones) Ben 1a y ben 1b y sus respectivos testigos (Tes 1a y Tes 1b) y controles (Con 1a y Con 1b). Valores Promedio \pm error estandar ($n = 10$).

CUENTA DIFERENCIAL DE LEUCOCITOS EN SANGRE PERIFERICA DE RATAS CONTROL SIN TRATAMIENTO



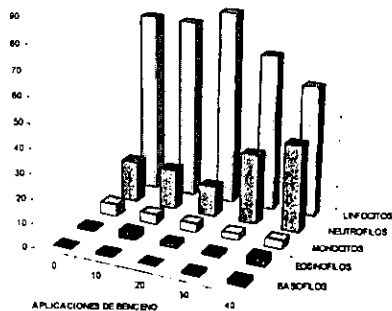
A

CUENTA DIFERENCIAL DE LEUCOCITOS EN SANGRE PERIFERICA DE RATAS TESTIGO TRATADAS CON ACEITE DE MÁZ



B

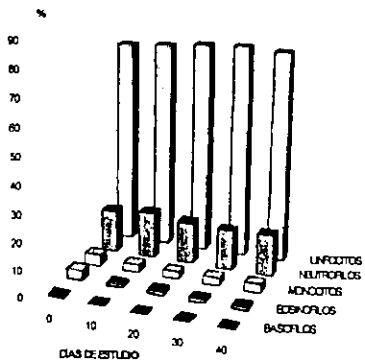
CUENTA DIFERENCIAL DE LEUCOCITOS EN SANGRE PERIFERICA DE RATAS EXPERIMENTALES TRATADAS CON BENCENO



C

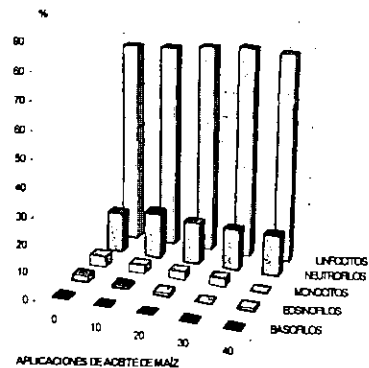
Gráfica 4. Cuenta diferencial de leucocitos de sangre periférica de ratas tratadas con 40 aplicaciones de benceno por vía subcutánea (Ben 1a) C y sus respectivos testigo (Tes 1a) B y control (Con 1a) A. Esquema "a". Valores promedio, n= 10

CUENTA DIFERENCIAL DE LEUCOCITOS EN SANGRE PERIFERICA DE RATAS CONTROL SIN TRATAMIENTO



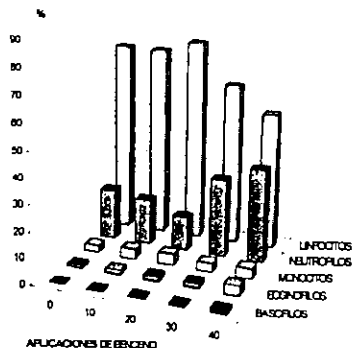
A

CUENTA DIFERENCIAL DE LEUCOCITOS EN SANGRE PERIFERICA DE RATAS TESTIGO TRATADAS CON ACEITE DE MAÍZ



B

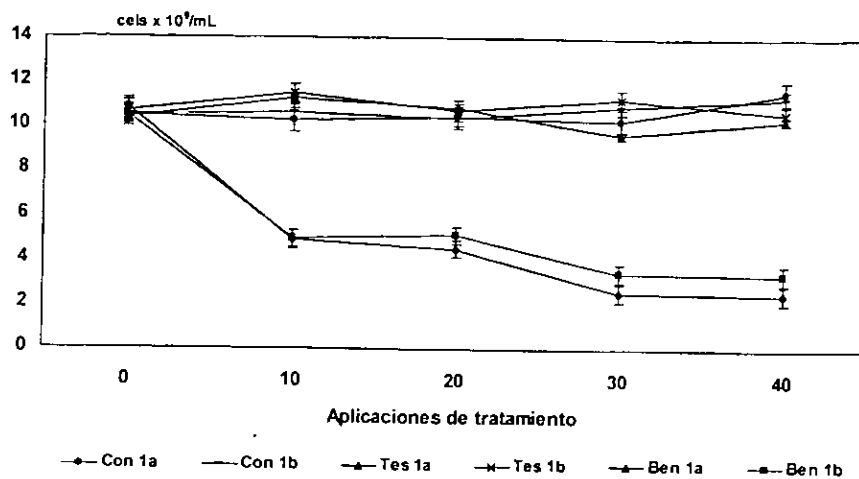
CUENTA DIFERENCIAL DE LEUCOCITOS EN SANGRE PERIFERICA DE RATAS EXPERIMENTALES TRATADAS CON BENCENO



C

Gráfica 5. Cuenta diferencial de leucocitos de sangre periférica de ratas tratadas con 40 aplicaciones de benceno por vía subcutánea (Ben 1b) C y sus respectivos testigo (Tes 1b) B y control (Con 1b) A. Esquema "b". Valores promedio, n= 10

Celularidad medular en rata



Gráfica 6. Concentración de células nucleadas totales de médula ósea de ratas expuestas a benceno durante 60 días (40 aplicaciones) Ben 1a y ben 1b y sus respectivos testigos (Tes 1a y Tes 1b) y controles (Con 1a y Con 1b). Valores Promedio \pm error estándar (n = 10).

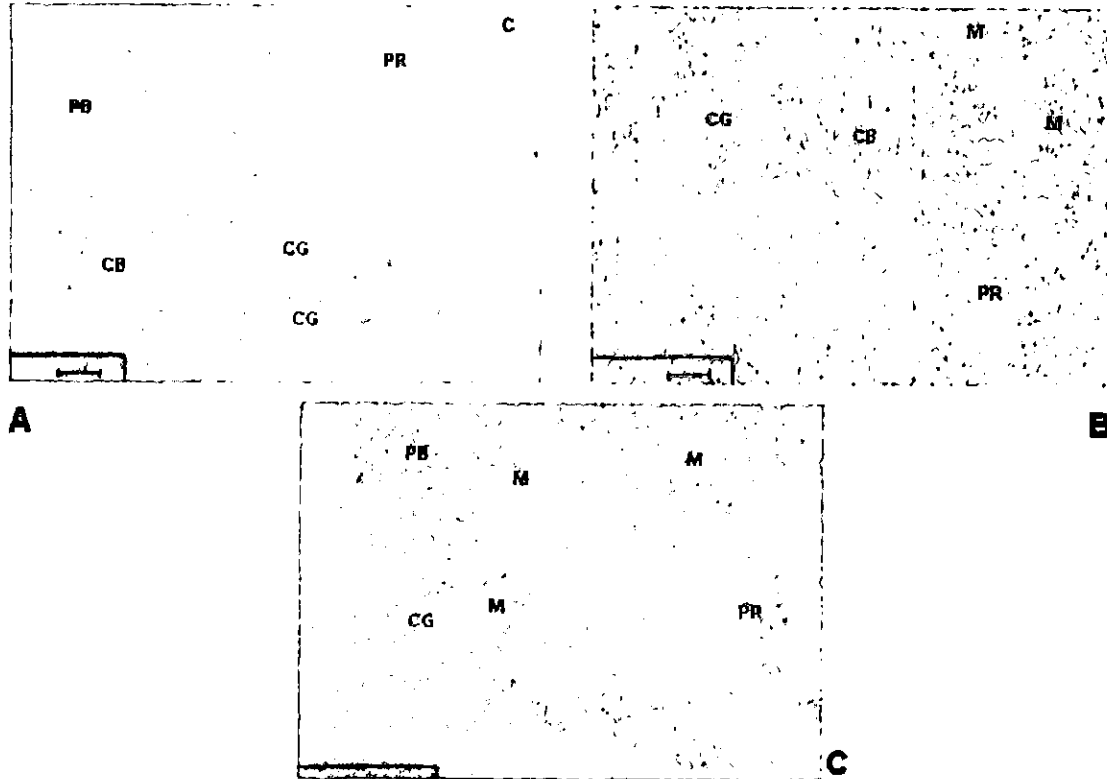


Figura 15. Cortes histológicos de bazo de rata: Control Con 1a (A y B) y experimental Ben 1a (C) al término del tratamiento (esquema 1a). Clave: C cápsula; PR pulpa roja; CB cordones de Billroth; PB pulpa blanca; CG centro germinativo; M megacariocito. Barra 80 μ m; 125x (A), 250x (B y C).

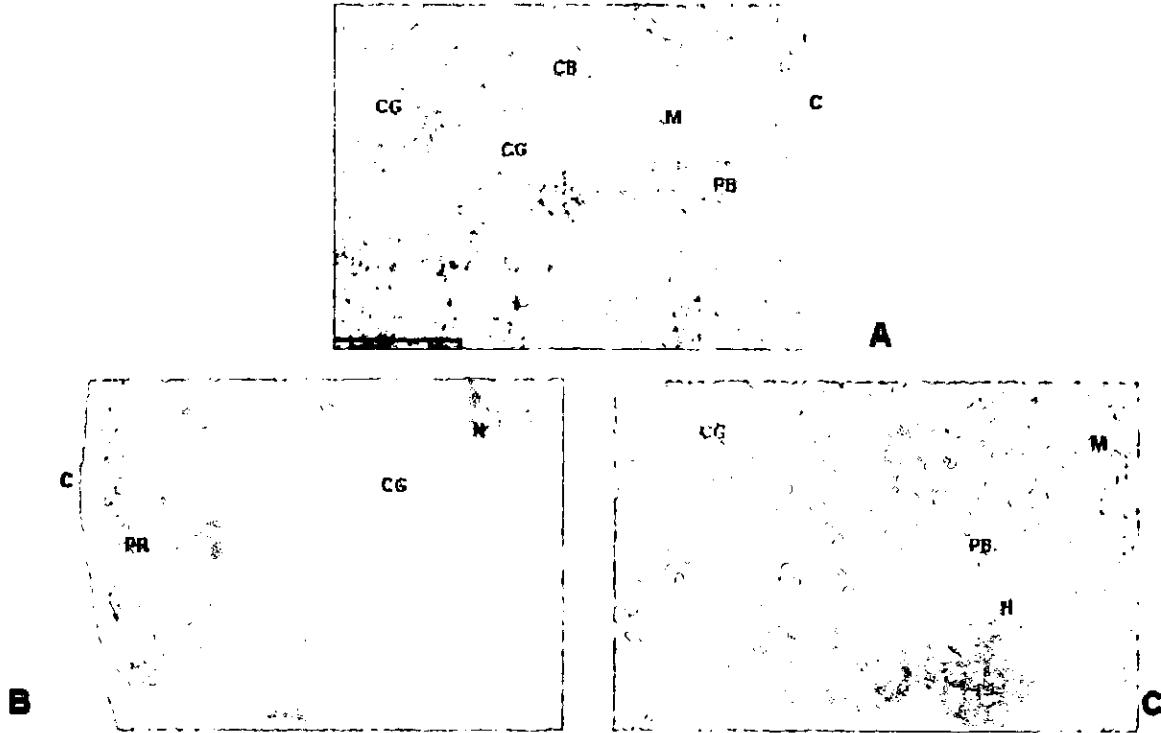


Figura 18. Cortes histológicos de bazo de rata: control Con 1b (A) y experimental Ben 1b (B y C) al término del periodo de tratamiento (esquema 1b). Clave: C cápsula; PR pulpa roja; CB cordones de Billroth; PB pulpa blanca; CG centro germinativo; M megacariocito; N necrosis. Barra 80 μ m; 125x (a y B), 250x (C).

RESULTADOS.

INDUCCIÓN EXPERIMENTAL DE ANEMIA APLÁSTICA EN RATÓN (Esquemas 2a y 2b).

Esquema 2a

Los animales del grupo que recibieron benceno (Ben 2a), mostraron irritabilidad, adinamia; cianosis y hematomas en las extremidades, se observó también: reducción de 42% en el peso corporal al final del experimento con relación a los grupos testigo y control (Tabla 9), además de alopecia, lesiones cutáneas moderadas, ulceraciones y costras hemáticas en la zona de aplicación del benceno.

En el examen postmortem, no se observó alteración en órganos internos a excepción del hígado, el cual en condiciones normales, presenta una color vino, en los ratones tratados con benceno, la coloración de este órgano, era café ocre (la apariencia era similar a la del hígado cocido); por otra parte el bazo presentó una reducción significativa en tamaño, peso, (68% con relación a los grupo control y testigo). Tabla 9 y necrosis que abarcaba desde la mitad del hilio a toda la región caudal.

Biometría hemática.

En el grupo que recibió benceno se apreció baja en la cuenta de eritrocitos a partir de la décima dosis, la cual se acentuó al acumular 15 dosis representando una disminución del 26.5% ($p < 0.001$) Gráfica 7. En la sangre de los animales de este grupo, se observaron alteraciones morfológicas diversas como: anisocitosis, crenocitosis y poiquilocitosis.

La concentración de hemoglobina se redujo significativamente después de completar las 15 dosis y se mantuvo así hasta alcanzar las 20 dosis (20%) Tabla 10.

En el grupo (Ben 2a) el hematocrito se mantuvo constante, sin embargo, el valor promedio total de los grupos testigo versus los tratados, mostró en éstos reducción

significativa (11%). El volumen celular medio (MCV) de los eritrocitos en este grupo se incrementó con el curso del tratamiento. Al comparar valores promedio de los grupos testigo en relación con los grupos experimentales, no se encontró variación significativa en este parámetro, lo cual hace que tanto los valores de concentración media de hemoglobina (MHC) y de concentración corpuscular media de hemoglobina (MHCH) muestren variaciones que no tienen significancia estadística. Tabla 10.

Por otra parte, el valor promedio final de reticulocitos en los ratones con benceno es 3.4 veces mayor con respecto al grupo testigo, obteniéndose un valor de $p < 0.001$, lo que muestra que dicha variación tiene significancia estadística. Tabla 10.

El número de plaquetas disminuyó significativamente a las 10 dosis, sin embargo, al llegar a la dosis 15 se incrementó el número y se mantuvo en ascenso hasta llegar a las 20 dosis alcanzando valores por encima de lo normal (43.53%). Gráfica 8.

La concentración de leucocitos presentó una baja significativa ($p < 0.001$) proporcional al número de dosis recibidas (80 % menor respecto al valor promedio del grupo control al final del experimento). Gráfica 9.

En los ratones tratados con benceno se observó disminución significativa en la concentración de linfocitos e incremento en la cuenta de neutrófilos, monocitos y eosinófilos, Gráfica 10C.

Cuantificación de células mieloides totales.

Se pudo apreciar disminución de la concentración de células mieloides desde la décima dosis (50% respecto al grupo testigo al final del experimento) Gráfica 12.

Histopatología del bazo.

Se observaron zonas de necrosis en la porción caudal del bazo hasta la mitad del órgano. Al realizar el estudio histopatológico, no se encontraron focos de hialinización o adelgazamiento de la cápsula de Bowman y de las trabéculas que penetran al parénquima esplénico (características que acompañan a ciertas patologías del bazo). Sin embargo, se observaron pliegues en la cápsula, resultantes de la pérdida de volumen del

órgano. En la organización de la pulpa roja no se observaron alteraciones de manera general, sin embargo, se apreciaron zonas con mayor número de células con aspecto de megacariocitos (Figuras 17C y 17D).

Esquema 2b

Los ratones tratados con benceno presentaron en menor grado los mismos signos clínicos aparentes y de comportamiento que los ratones del esquema 2a. La disminución del peso corporal al final del experimento respecto a los grupos control y testigo fue del 12% (Tabla 9).

En el examen postmortem se encontró también reducción importante de la masa esplénica en su tamaño y peso del 49% (Tabla 10) y no se apreció necrosis.

Biometría hemática

A partir de la acumulación de 15 administraciones se observó una disminución del 32.29% en la concentración de eritrocitos ($p < 0.001$), la cual se mantuvo constante (Gráfica 7). En los ratones tratados con benceno se observó una disminución significativa de la hemoglobina durante la primeras 10 dosis (21.41%) acentuándose en relación directa con el número de dosis administradas (34.03% al término del experimento) Tabla 10. Al igual que en el esquema 2b los eritrocitos mostraron alteraciones morfológicas diversas como: anisocitosis, crenocitosis y poiquilocitosis.

La concentración de hemoglobina al final del experimento representó 71% del valor inicial en el lote tratado (día 0). Al comparar los valores promedio de los grupos testigo y tratado la reducción es del 25%. Las diferencias entre ambos grupos testigo y tratado con las dosis ensayadas fueron altamente significativas ($p < 0.001$) Tabla 11.

A partir de las 10 aplicaciones de benceno, el valor global del hematocrito del grupo tratado disminuyó 36% con respecto a sus grupos control y testigo ($p < 0.001$), acentuándose con el curso del experimento (Tabla 10).

En este grupo se observó un incremento en el volumen celular medio (VCM) de los eritrocitos de los ratones que recibieron 15 y 20 aplicaciones de benceno. No se apreciaron variaciones significativas en los valores de hemoglobina corpuscular media (HCM) y la concentración media de hemoglobina corpuscular (CMHC) Tabla 10.

Por otra parte, la concentración de reticulocitos no presentó variación significativa.

La concentración de plaquetas se mantuvo sin variación hasta las 10 dosis pero disminuyó significativamente ($p < 0.001$) a partir de la 15 y se conservó así hasta el final del experimento. La reducción de plaquetas fue del 59% con respecto al testigo al final del experimento (Gráfica 8).

Se observó disminución en la concentración de leucocitos (64.70%) al transcurrir 10 dosis con un repunte al momento de evaluar a las 15 dosis que no rebasó la concentración inicial (tiempo 0) para finalmente descender hasta el 54% (Gráfica 9).

En los ratones tratados con benceno, se observó una disminución significativa de los linfocitos a partir de la dosis 10 que se mantuvo constante hasta el final del experimento, se observó también un incremento en los neutrófilos monocitos y eosinófilos con respecto al grupo testigo (Gráfica 11C).

Cuantificación de células mieloides totales.

La concentración de las células mieloides fue inversamente proporcional al número de dosis recibidas entre la dosis 0, 15 hasta el final del experimento, la disminución celular representó 55% respecto al grupo testigo (Gráfica 12).

Histopatología del bazo.

La organización de la pulpa roja no se observó alterada de manera general, se encontraron zonas con menor número de megacariocitos en comparación con el bazo de los animales tratados con benceno mediante el esquema 1. La pulpa blanca presentó desarreglo en su organización como consecuencia del tratamiento. La zona marginal nodular se observó difusa, en tanto que en el centro germinativo se apreciaron focos necróticos (Figuras 18C y 181D).

INDUCCIÓN EXPERIMENTAL DE ANEMIA APLÁSTICA EN RATÓN (Esquemas 2a y 2b).

PESO CORPORAL Y ESPLÉNICO

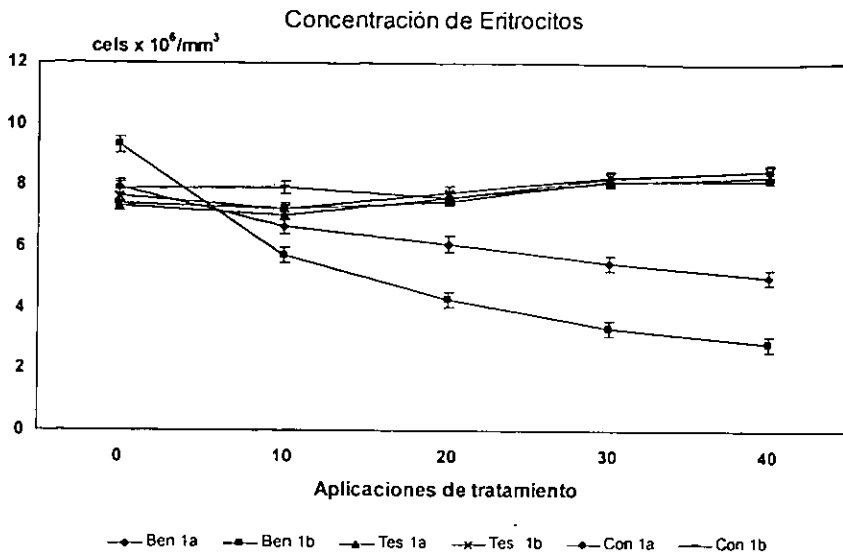
PESO CORPORAL g	APLICACIONES	CONTROL 2a	TESTIGO 2a	BENCENO 2a	CONTROL 2b	TESTIGO 2b	BENCENO 2b
	10	55.0 +/- 1.35	57.3 +/- 1.05	32.5 +/- 1.05 *	49.0 +/- 1.05	53.5 +/- 2.03	45.6 +/- 2.75
	15	55.5 +/- 2.25	58.6 +/- 2.35	37.8 +/- 1.25 *	49.0 +/- 1.02	55.6 +/- 1.75	45.2 +/- 2.05 *
	20	54.1 +/- 1.75	58.9 +/- 1.95	31.4 +/- 1.95 *	49.5 +/- 0.75	55.6 +/- 1.95	43.5 +/- 2.55 *
PESO ESPLÉNICO g	10	0.292 +/- 0.004	0.300 +/- 0.005	0.119 +/- 0.009	0.375 +/- 0.018	0.315 +/- 0.009	0.239 +/- 0.011
	15	0.266 +/- 0.005	0.292 +/- 0.006	0.087 +/- 0.009*	0.292 +/- 0.011	0.300 +/- 0.005	0.182 +/- 0.009
	20	0.254 +/- 0.008	0.285 +/- 0.008	0.081 +/- 0.007*	0.300 +/- 0.006	0.298 +/- 0.003	0.151 +/- 0.007

Tabla 9. Peso corporal y esplénico de ratones tratadas con benceno y sus respectivos controles y testigos. Los datos se expresan como valores promedio +/- error estándar (n = 10). *Significancia estadística (P < 0.001) con respecto al testigo y control.

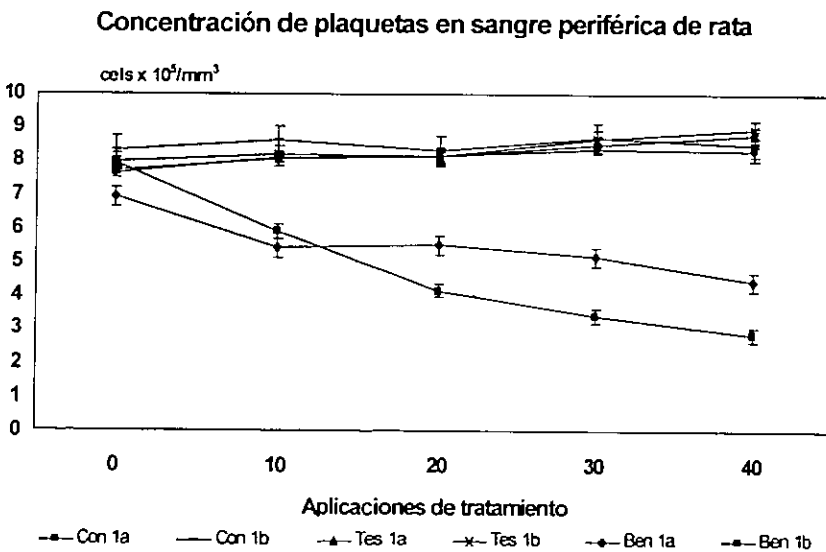
PARÁMETROS ERITRIODES

PARÁMETRO	APLICACIONES	CONTROL2a	TESTIGO2a	BENCENO2a	CONTROL2b	TESTIGO2b	BENCENO2b
HEMOGLOBINA (g / dL)	0	11.59 +/- 0.45	11.49 +/- 0.74	11.39 +/- 0.47	9.350 +/- 0.61	9.870 +/- 0.39	9.540 +/- 0.09
	10	10.16 +/- 0.68	10.16 +/- 0.30	9.96 +/- 0.87	10.874 +/- 1.46	10.87 +/- 0.64	8.546 +/- 1.24
	15	9.91 +/- 0.74	9.90 +/- 0.34	9.31 +/- 0.48	10.853 +/- 1.30	10.83 +/- 0.58	7.174 +/- 1.30*
	20	10.31 +/- 0.07	10.3 +/- 0.31	8.25 +/- 1.22*	10.751 +/- 1.06	10.75 +/- 0.44	7.092 +/- 1.38*
HEMATOCRITO (%)	0	53.08 +/- 2.13	51.08 +/- 3.08	38.30 +/- 1.06	40.75 +/- 1.41	43.98 +/- 1.66	39.28 +/- 1.45
	10	49.52 +/- 1.99	45.63 +/- 2.46	36.45 +/- 2.60	40.48 +/- 2.27	40.49 +/- 2.19	25.78 +/- 1.81*
	15	45.54 +/- 1.51	45.54 +/- 1.40	38.47 +/- 1.82	39.27 +/- 2.10	39.28 +/- 1.45	22.36 +/- 0.86*
	20	44.80 +/- 0.77	44.81 +/- 2.45	39.98 +/- 2.92	45.30 +/- 2.58	45.31 +/- 0.85	28.73 +/- 1.01*
VOLUMEN CELULAR MEDIO (M.C.V.) (Fl)	0	282.5 +/- 40.5	186.12 +/- 3.10	163.25 +/- 12.3	104.19 +/- 2.49	195.81 +/- 7.91	154.16 +/- 10.3
	10	259.9 +/- 5.76	259.54 +/- 48.5	164.15 +/- 28.4	164.62 +/- 44.31	164.62 +/- 6.8	95.93 +/- 8.81
	15	189.3 +/- 4.31	189.36 +/- 19.4	198.07 +/- 11.6	160.32 +/- 17.71	160.33 +/- 4.7	130.92 +/- 5.17
	20	204.3 +/- 17.8	204.31 +/- 14.2	200.0 +/- 38.16	177.04 +/- 12.97	177.04 +/- 19	218.14 +/- 7.40*
HEMOGLOBINA CELULAR MEDIA (M.H.C.) (pg)	0	58.69 +/- 9.25	42.65 +/- 3.79	39.41 +/- 5.03	36.60 +/- 3.47	44.07 +/- 2.71	37.35 +/- 2.78
	10	54.12 +/- 3.13	54.12 +/- 9.51	45.29 +/- 7.01	44.55 +/- 8.68	44.55 +/- 3.43	39.55 +/- 3.36
	15	41.07 +/- 2.61	41.07 +/- 3.84	48.11 +/- 5.55	44.30 +/- 3.51	44.30 +/- 2.86	43.01 +/- 2.44
	20	46.88 +/- 9.19	46.90 +/- 1.21	40.77 +/- 7.61	53.88 +/- 1.10	53.89 +/- 10.1	52.46 +/- 2.13
CONCENTRACIÓN MEDIA DE HEMOGLOBINA CELULAR (M.C.H.C.) (%)	0	22.15 +/- 1.24	18.71 +/- 4.32	29.86 +/- 1.54	23.13 +/- 1.99	22.7 +/- 1.38	25.25 +/- 2.09
	10	20.86 +/- 2.60	20.86 +/- 1.80	27.29 +/- 5.51	27.41 +/- 1.64	27.42 +/- 2.85	35.55 +/- 1.64
	15	21.80 +/- 1.51	21.81 +/- 0.40	24.17 +/- 3.51	27.32 +/- 0.36	27.33 +/- 1.66	33.18 +/- 0.36
	20	23.34 +/- 0.73	23.34 +/- 1.36	20.59 +/- 2.47	23.71 +/- 1.43	23.70 +/- 0.42	25.67 +/- 1.43
RETICULOCITOS (%)	0	.008 +/- .0004	.007 +/- .0008	.019 +/- .0130*	.008 +/- .0008	.021 +/- .0140	.007 +/- .0008
	10	.007 +/- .0009	.005 +/- .0002	.011 +/- .0080*	.007 +/- .0008	.009 +/- .0001	.011 +/- .0017
	15	.006 +/- .0009	.080 +/- .0090	.013 +/- .0020	.008 +/- .0008	.006 +/- .0002	.018 +/- .0035*
	20	.003 +/- .0013	.006 +/- .0002	.007 +/- .0008	.005 +/- .0009	.001 +/- .0008	.002 +/- .0013

Tabla 10. Efecto de la administración subcutánea de benceno en rata sobre los parámetros eritroides. Los datos se expresan como promedio +/- error estándar (n = 10). *Significancia estadística con respecto al testigo y control.

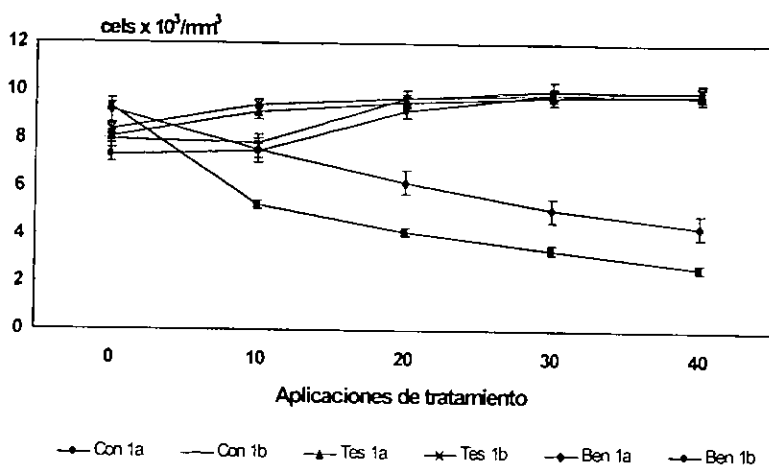


Gráfica 1. Concentración de eritrocitos en sangre periférica de ratas expuestas a benceno durante 60 días (40 aplicaciones) Ben 1a y Ben 1b y sus respectivos testigos (Tes 1a y Tes 1b) y controles (Con 1a y Con 1b). Valores Promedio +/- error estandar (n = 10).

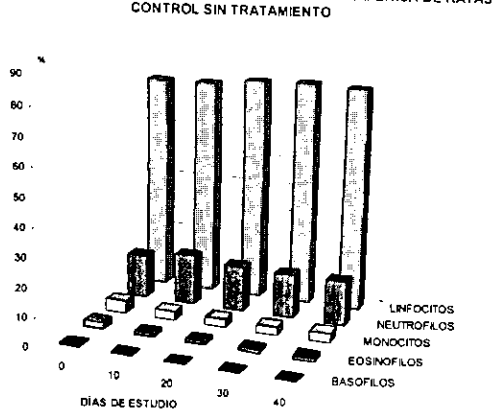


Gráfica 2. Concentración de plaquetas en sangre periférica de ratas expuestas a benceno durante 60 días (40 aplicaciones) Ben 1a y Ben 1b y sus respectivos testigos (Tes 1a y Tes 1b) y controles (Con 1a y Con 1b). Valores Promedio +/- error estandar (n = 10).

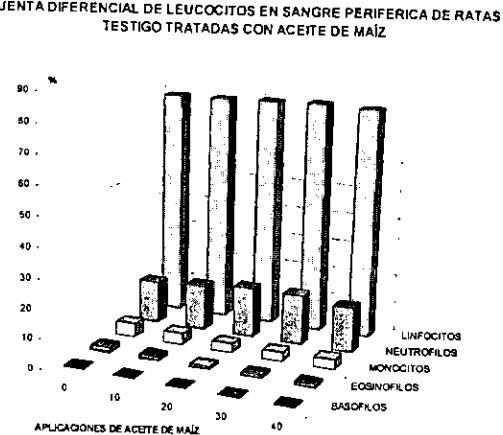
Concentración de leucocitos en sangre periférica de rata



Gráfica 3. Concentración de leucocitos en sangre periférica de ratas expuestas a benceno durante 60 días (40 aplicaciones) Ben 1a y ben 1b y sus respectivos testigos (Tes 1a y Tes 1b) y controles (Con 1a y Con 1b). Valores Promedio +/- error estandar (n = 10).

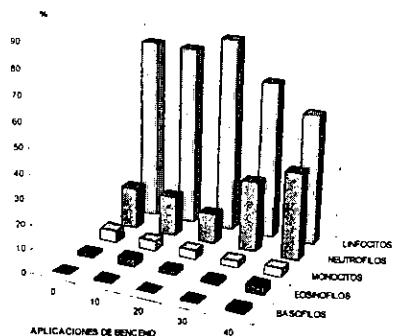


A



B

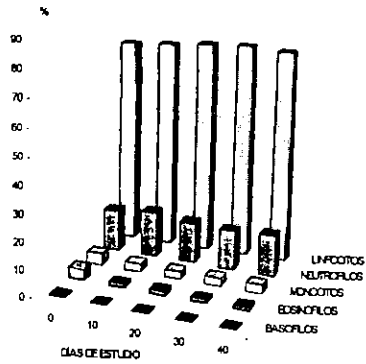
CUENTA DIFERENCIAL DE LEUCOCITOS EN SANGRE PERIFERICA DE RATAS EXPERIMENTALES TRATADAS CON BENCENO



C

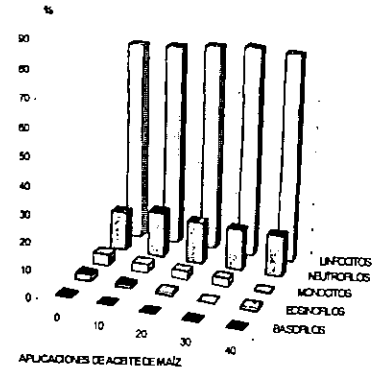
Gráfica 4. Cuenta diferencial de leucocitos de sangre periférica de ratas tratadas con 40 aplicaciones de benceno por vía subcutánea (Ben 1a) C y sus respectivos testigo (Tes 1a) B y control (Con 1a) A. Esquema "a". Valores promedio, n= 10

CUENTA DIFERENCIAL DE LEUCOCITOS EN SANGRE PERIFERICA DE RATAS CONTROL SIN TRATAMIENTO



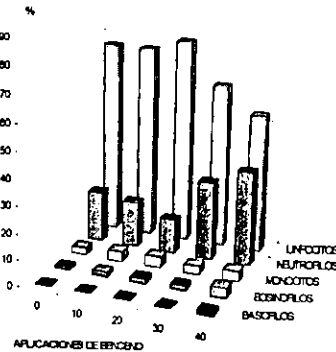
A

CUENTA DIFERENCIAL DE LEUCOCITOS EN SANGRE PERIFERICA DE RATAS TESTIGO TRATADAS CON ACEITE DE MAÍZ



B

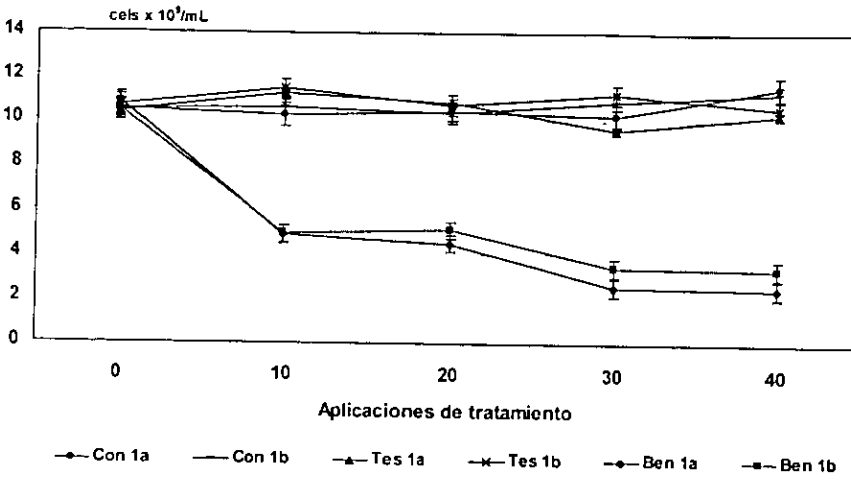
CUENTA DIFERENCIAL DE LEUCOCITOS EN SANGRE PERIFERICA DE RATAS EXPERIMENTALES TRATADAS CON BENCENO



C

Gráfica 5. Cuenta diferencial de leucocitos de sangre periférica de ratas tratadas con 40 aplicaciones de benceno por vía subcutánea (Ben 1b) C y sus respectivos testigo (Tes 1b) B y control (Con 1b) A. Esquema "b". Valores promedio, n= 10

Celularidad medular en rata



Gráfica 6. Concentración de células nucleadas totales de médula ósea de ratas expuestas a benceno durante 60 días (40 aplicaciones) Ben 1a y ben 1b y sus respectivos testigos (Tes 1a y Tes 1b) y controles (Con 1a y Con 1b). Valores Promedio \pm error estandar ($n = 10$).

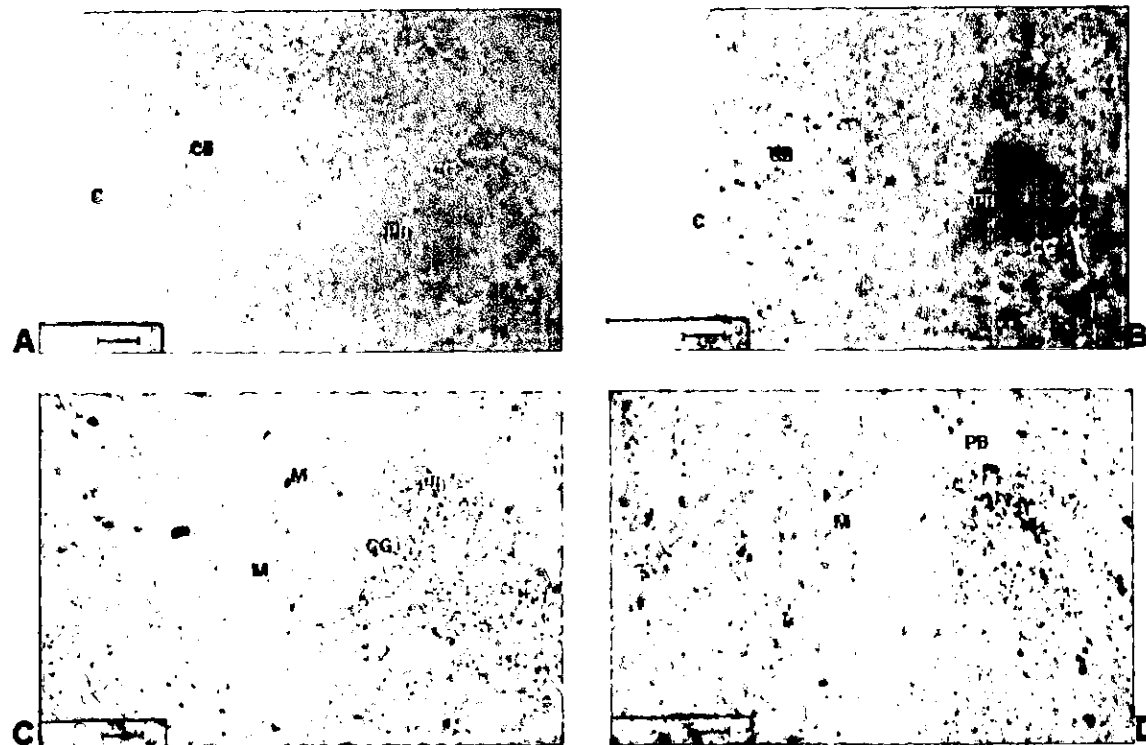


Figura 17. Cortes histológicos de bazo de ratón: control Con 2a (A y C) y experimental Ben 2a (B y D) al término del periodo de tratamiento (esquema 2a). Clave: C cápsula; PR pulpa roja; CB cordones de Billroth; PB pulpa blanca; CG centro germinativo; M megacariocito. Barra 80 μ m; 125x (A y B), 250x (C y D).

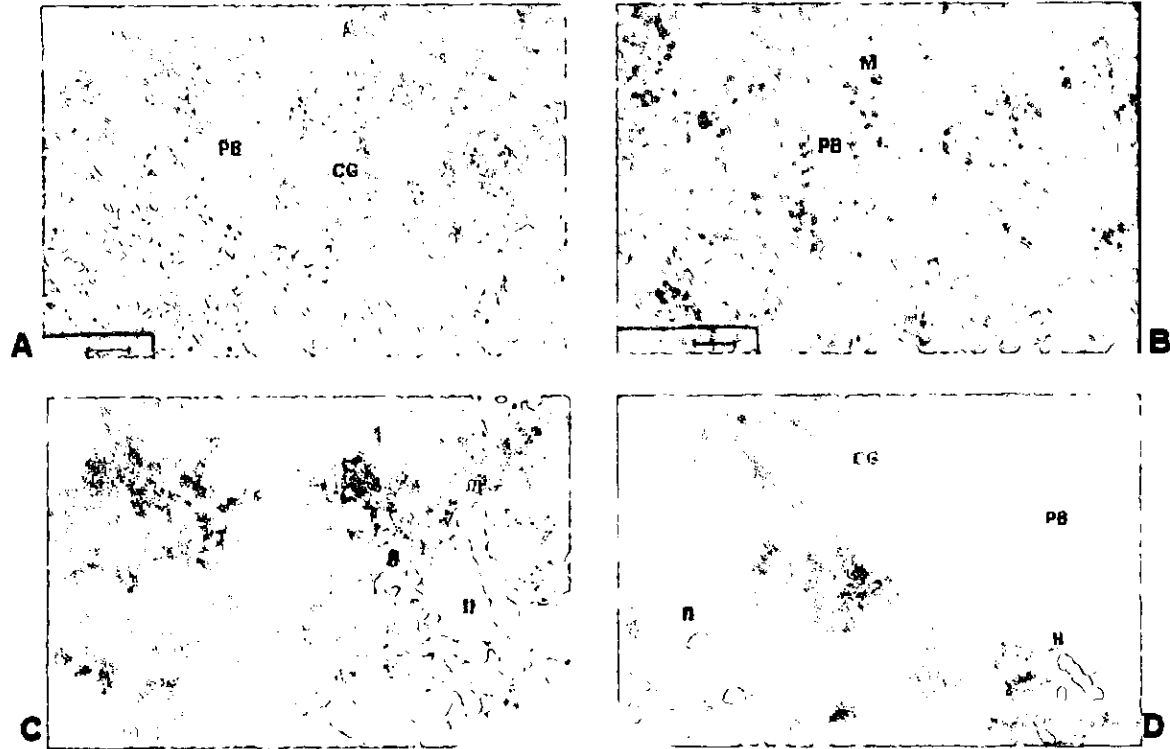


Figura 18. Cortes histológicos de bazo de ratón: control Con 2b (A y B) y experimental Ben 1b (C y D) al término del periodo de tratamiento (Esquema 2b). Clave: PB pulpa blanca; CG centro germinativo; PB pulpa blanca; M megacariocito, N necrosis. Barra 80 μ m; 125x (A y D), 250 (B y C).

DISCUSION.

INDUCCION EXPERIMENTAL DE ANEMIA APLÁSTICA EN RATA (Esquemas 1a y 1b).

Se ha demostrado experimentalmente que la exposición a benceno por inhalación, en concentraciones de 100 a 1000 ppm, desde 30 min a 7 h por día durante 2 a 30 semanas, provoca alteraciones hematológicas en ratas. Boje y colaboradores (1970) utilizando 400 ppm/19 ventilaciones durante 36 días provocaron anemia moderada, leucocitosis, trombocitopenia y reticulocitosis con depresión reversible de las células mielopoyéticas. Gill y cols. (1980), al emplear 100, 500 y 1000 ppm 6 h/día por vía inhalatoria durante 6 semanas, reportaron leucopenia declarada sin alteración en la celularidad medular.

Dobrokholov en 1972, al administrar benceno por vía subcutánea indujo alteraciones cromosómicas en células de la médula ósea al inyectar 1 mL/Kg de peso durante 12 días. Asimismo, los resultados obtenidos en esta etapa son acordes con los reportados por Gerarde (1956), Gerarde & Ahlstrom (1966) quienes al inyectar por vía subcutánea 1 mL de benceno/Kg de peso durante 14 días reportaron leucopenia con cambios no significativos en el hematocrito.

En los trabajos mencionados anteriormente, la evaluación del daño provocado por la administración del benceno es muy diferente, ya que está con relación al tiempo de duración y objetivos propios de la investigación, en la mayoría de los estudios no se enfatiza el efecto del benceno sobre la médula ósea a mediano y a largo plazo.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo concuerdan con los reportados por Koike y colaboradores (1959), quienes al administrar 1 y 2 mL de benceno/Kg de peso 3 a 5 semanas por vía subcutánea, causaron anemia hemolítica y disminución en la concentración de células nucleadas en la médula femoral.

La disminución de células de médula ósea en las ratas tratadas con benceno el esquema (1a), estuvo asociada con una pancitopenia en sangre periférica. En los animales de este grupo, no se observaron lesiones macroscópicas del bazo (ni en otros órganos internos como hígado o riñón que intervienen en los procesos hematopoyéticos), lo que significa que no se causó esplenotoxicidad, lo que ayudó a la clara observación del cuadro de anemia aplástica; ya que el bazo es el órgano censor encargado de retirar de la circulación a aquellas células que han cumplido su ciclo o bien a las que se encuentran con defectos estructurales (principalmente eritrocitos y plaquetas).

La eritrocitopenia observada en las ratas tratadas con benceno en éste esquema (1a), es acentuada y probablemente debida al efecto directo de este solvente sobre las células precursoras hematopoyéticas de la médula ósea o bien debidas a una mayor susceptibilidad de los eritrocitos a cambios de tonicidad, manifestándose como anemia macrocítica hipocrómica, además de otras alteraciones morfológicas diversas.

La leucopenia observada en éste grupo de animales, es también acentuada y en relación directa con el número de aplicaciones de benceno sobre la médula ósea; tomando en cuenta que ésta línea germinal es únicamente regulada por la médula. En todos los tiempos observados, la disminución en la concentración de leucocitos totales en sangre periférica, estuvo asociada con el grado de hipoplasia medular.

No obstante, la disminución general de los leucocitos totales, el incremento en el porcentaje de los granulocitos (neutrófilos y eosinófilos) podría deberse a la disminución de la cantidad de linfocitos circulantes, a mecanismos de defensa inespecíficos o a un estímulo específico de los metabolitos secundarios del benceno como las hidroquinonas, las cuales han demostrado tener actividad estimulante *in vivo* e *in vitro* sobre las unidades formadoras de colonias de granulocitos (neutrófilos)/macrófagos (monocitos) Henschler *et al.* 1996.

A lo largo del tratamiento, en las ratas del grupo Ben 1a, las plaquetas mostraron un decremento constante debido a la hipocelularidad severa de la médula ósea, la cual resultó incapaz de producir a sus precursores los megacariocitos.

A pesar de no presentar alteraciones macroscópicas que impidieran la función de regular la concentración de eritrocitos y plaquetas en sangre periférica, al retirar de la misma a los elementos viejos o dañados no se vio afectada, el bazo sufrió modificaciones en su organización y estructura microscópica, por lo que no podía funcionar como órgano hematopoyético alterno (productor de plaquetas); los megacariocitos encontrados en él, de acuerdo a su morfología observada con los criterios de clasificación de Levine (1981) y Bull (1997) no son productores de plaquetas.

Es importante remarcar que en el segundo esquema para rata (1b) se observó una disminución en la concentración de eritrocitos, corroborada por la variación de parámetros relacionados como; concentración media de hemoglobina (C.M.H.); volumen corpuscular medio (V.C.M.); concentración media de hemoglobina corpuscular (C.M.H.C.), dicha disminución podría ser el resultado del efecto directo del benceno sobre las células precursoras hematopoyéticas de la médula ósea, o bien debidos a una mayor susceptibilidad de los eritrocitos a cambios de tonicidad o bien susceptibilidad a el benceno circulante y sus diferentes metabolitos, los cuales al tener una gran afinidad por el tejido graso, causan alteraciones a nivel de membrana celular, modificando su estructura, ocasionando deformaciones de la célula; todo esto se manifiesta como anemia macrocítica hipocrómica, además de otras alteraciones morfológicas.

Aunque los parámetros medidos por otros autores, en la mayoría de los casos no son todos los que se midieron en el presente trabajo, los resultados obtenidos en esta fase para ambos esquemas, concuerdan con los reportados por otros autores cuyos trabajos han sido administrando el benceno por vía oral o inhalatoria. La administración oral de benceno en concentraciones de 30 a 450 mg/Kg de peso por periodos de 25 a 112 días causa alteraciones hematológicas en ratas. Irons al aplicar 1 mL/Kg de peso vía subcutánea durante 10 días reportó disminución de las poblaciones linfoides en sangre periférica.

Scheding y colaboradores (1992) administraron 10 mg de benceno /Kg de peso por vía oral en ratas durante 56 días, reportaron daños reversibles sobre los granulocitos de sangre periférica; al ampliar el tratamiento a 112 días ocasionaron que los daños

fueran irreversibles, observando también disminución en la concentración de células eritroides de la médula ósea.

Los resultados obtenidos para el primer esquema (1a) en esta fase, concuerdan con los reportados por Scheduling para la vía oral, no obstante que la dosis empleada en nuestro caso es dieciséis veces mayor (160 mg/Kg). En este caso se consiguió prolongar el tiempo de administración al equivalente a 112 días reportados por el autor.

Con el fin de corroborar los resultados obtenidos, y corroborar la reversibilidad de las alteraciones causadas, se realizó otro experimento (datos no incluidos) en el que se administró benceno a 3 grupos de ratas benceno hasta completar 40 aplicaciones (60 días) manteniéndolas sin tratamiento 60 días más; analizándolas a los 75, 90, 105 y 120 días de iniciado el experimento; además de la biometría hemática y los parámetros clínicos citados, se incluyeron las pruebas de fragilidad eritrocitaria y examen citoquímico de peroxidasa; se observó que el grado de hipoplasia medular se mantuvo hasta el final del experimento, no obstante, la concentración total de leucocitos aumentó conforme transcurrió el tiempo, lo que podría atribuirse a una alteración en la célula multipotencial mielóide precursora de eritrocitos, granulocitos y plaquetas, mas que a un daño en la célula troncal totipotencial (stem), ya que no se afecta la proliferación de la línea linfóide, lo cual está de acuerdo con los hallazgos en pacientes con anemia aplásica cuyos linfocitos llegan a constituir el 90% de los leucocitos en sangre periférica como lo reportan Heimpel *et al* (1984) y Tapia *et al* (1990).

INDUCCIÓN EXPERIMENTAL DE ANEMIA APLÁSTICA EN RATÓN (Esquemas 2a y 2b).

Puede observarse que los animales tratados con benceno sufrieron alteraciones tanto de comportamiento como clínicas, dichas alteraciones fueron mas acentuadas en los grupos tratados con el esquema (2a) cuyos bazos presentaron zonas necróticas macroscópicas no observadas en los animales tratados del esquema (2b).

En condiciones normales, el bazo es el órgano responsable de regular la concentración de eritrocitos y plaquetas en sangre circulante, al retirar de la misma a los elementos viejos o dañados. Es posible que la lesión provocada haya impedido que el bazo cumpliera con su función como órgano censor y por tanto que las plaquetas se acumularan en la circulación, no obstante que la médula ósea presentaba hipoplasia severa y era incapaz de producir plaquetas ni sus precursores los megacariocitos (Tavassoli 1991). Bajo estas condiciones, el bazo debido a su estado de intoxicación, que modificó su estructura y organización no podía funcionar como órgano alterno, la presencia de megacariocitos en este órgano, de acuerdo con su morfología observada y con los criterios de clasificación de Levine (1981) y Boll (1997) no son productores de plaquetas, considerando que su concentración se regula por retroalimentación y debido a su alto número en sangre no es requerida la liberación de nuevas plaquetas

Debido también a la lesión del bazo, los eritrocitos no fueron retirados eficientemente a pesar de presentar alteraciones morfológicas de diferentes tipos. La población predominante fue de tipo macrocítico hipocrómico, la cual pudo haber disminuido también por el efecto tóxico directo del benceno y sus metabolitos en sangre, por lo que no se apreció la disminución tan acentuada como se esperaba.

La leucopenia observada en los ratones tratados con benceno en el esquema 1b es acentuada y debida al efecto directo de éste solvente sobre la médula ósea; tomando en cuenta que ésta línea celular no es regulada por el bazo los resultados se observan con mayor claridad. Es importante recalcar que en todos los tiempos observados, la disminución en la concentración de leucocitos estuvo asociada con la depleción de la médula ósea.

A pesar de la disminución general de los leucocitos, el incremento en la concentración relativa de granulocitos podría ser debido entre otras causas a una respuesta inmune inespecífica contra agentes patógenos tales como bacterias, (tomando en cuenta que el ratón es una especie mas susceptible de padecer enfermedades por microorganismos que la rata) particularmente de los neutrófilos o bien a un estímulo específico de los productos metabólicos del benceno como las hidroquinonas, las cuales han mostrado tener actividad estimulante *in vivo* e *in vitro* sobre las unidades formadoras

de colonias de granulocitos/macrófagos que son las células precursoras de los neutrófilos /monocitos (Henschler, *et al.* 1996).

Con excepción de la trombocitosis es apreciable una pancitopenia generalizada y una hipoplasia severa de la médula ósea. Debido a que el ratón metaboliza el benceno dando origen a productos de oxidación altamente tóxicos para el hígado, bazo y la médula ósea (Gill y colaboradores 1980), causando reducción en la población de células mieloides, las cuales no son capaces de revertir la aplasia en ratones, lo que corrobora que el benceno daña a las células de la médula ósea incluyendo a las células tronco hematopoyéticas stem (Till & McCulloch, 1961). Los animales presentaron los signos característicos de una anemia aplásica, sin embargo la trombocitopenia que debería estar presente fue enmascarada por la esplenotoxicidad causada por la administración mas frecuente del solvente.

En los ratones tratados con el esquema (2b), la reducción de células de médula ósea, estuvo asociada con la reducción en la concentración de eritrocitos, plaquetas y leucocitos en sangre. En este grupo no se observaron lesiones en el bazo, lo que significa que no se indujo daño esplénico, por lo que el cuadro de anemia aplásica se observó claramente.

Con el fin de corroborar los resultados obtenidos en el esquema (2b) y determinar la reversibilidad a corto plazo de las alteraciones causadas, se realizó otro experimento (resultados no incluidos), sacrificando un grupo de ratones directamente a las 20 dosis de benceno, y otro con un periodo de recuperación de nueve días posteriores a la última exposición al solvente, se obtuvieron los mismos resultados (pancitopenia periférica e hipoplasia medular), lo cual confirmó el cuadro de anemia aplásica persistente. (Los recuentos celulares se realizaron por medio de un contador automatizado de células Coulter Counter Z1).

Los resultados presentados aquí concuerdan con los obtenidos por otros autores cuyos trabajos han sido realizados aplicando benceno por vía inhalatoria u oral; en el trabajo de Cronkite *et al* (1985), los ratones fueron sometidos a inhalación de benceno en concentraciones de 32 hasta 1280 mg/m³ (10 a 400 ppm) por dos semanas, seis horas

diarias, los cinco días de la semana, y se observó que a concentraciones mayores de 320 mg/m³ la celularidad medular disminuyó y bajó el número de células stem pluripotenciales (Gill, 1980). A dosis mayores de 960 mg/m³, estos autores reportaron baja significativa en el hematocrito, hemoglobina, cuenta de eritrocitos, leucocitos, plaquetas, porcentaje de linfocitos y reversión de estos parámetros dentro de las primeras cuatro semanas de suspendido el tratamiento, alcanzando una repoblación en la celularidad medular del 92% a las 20 semanas de suspendido el tratamiento con benceno. Los estudios a largo plazo en los cuales se exponen los ratones a 50 ppm de benceno por mas de 6 meses mostraron reducción de la concentración de leucocitos circulantes (leucopenia).

La exposición más baja que tiene efectos hematológicos en ratón, fue la inhalación de 10 ppm de benceno seis horas diarias, los cinco días de la semana durante 25.5 semanas, lo que provocó disminución en el número de eritrocitos y de leucocitos circulantes, baja en el número de células nucleadas en el bazo e inhibición de la capacidad para desarrollar las unidades formadoras de colonias de eritrocitos *in vitro*. (Baarson 1984).

Por otra parte administración por vía oral de benceno provoca hematotoxicidad en ratas y ratones. Huff (1989) mediante alimentación forzada con benceno en aceite de maíz durante 120 días con concentraciones de 25 a 400 mg/kg de peso los cinco días de la semana, provocando leucopenia y depresión linfoide en células B de bazo en ratas y ratones.

Los resultados obtenidos con el esquema 2b de administración del benceno, coinciden con los reportados por Baarson et al. 1984, Ward 1985 y Abraham 1996, quienes indujeron hipoplasia medular severa (anemia aplástica) al administrar dosis entre 32 y 960 ppm durante 25 y 13 semanas respectivamente, mientras que nosotros administramos 3.7 ppm en cada aplicación, lo que acumuló 37, 74, 11 y 148 ppm (130, 260, 390 y 520 mg/Kg de peso) en dos, cuatro, cinco y siete semanas respectivamente. Sin que se presentara la muerte de los animales expuestos al benceno antes de finalizar el experimento. Lo que muestra que éste esquema de inducción parece adecuado frente a los mencionados anteriormente y al esquema 1b ensayado por nosotros, en el que se administraron las mismas dosis en una, dos y media y cuatro semanas, lo que concuerda

con los hallazgos de Tice y colaboradores (1989), quienes encontraron que la mielotoxicidad de benceno en ratones es mas pronunciada en administraciones de régimen discontinuo que en exposición continua.

CONCLUSIONES.

- Con ambos esquemas de inducción de anemia aplástica en rata, la administración de benceno por vía subcutánea durante 60 días (40 aplicaciones) provocaron pancitopenia aplásica sostenida en ausencia de alteraciones no hematológicas (aún después de 45 días de haber finalizado el tratamiento).

- En ratón, a pesar de que los dos esquemas de tratamiento con benceno ensayados provocaron un cuadro de anemia aplástica, el esquema (2a) causó efectos colaterales que alteran la manifestación de la anemia aplástica. En el esquema (b) se logró provocar de manera clara un cuadro característico de anemia aplástica, lográndose además la supervivencia de los animales de experimentación con el menor número de alteraciones no hematológicas.

- Con este trabajo se ha logrado establecer un modelo experimental para la inducción de anemia aplástica con benceno en rata y ratón por vía subcutánea, con resultados equiparables a los comunicados para la inhalación de éste compuesto, logrando con ello disminuir el tiempo de tratamiento y el empleo de equipo costoso, teniendo mayor control sobre la dosificación, el tiempo de tratamiento y la administración del benceno, así como conocer el comportamiento del cuadro a diferentes tiempos de aplicación. Logrando con este sistema de trabajo dos modelos de bajo costo y fácil reproducción.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Abraham, N G. 1996. Hematopoietic Effects of Benzene Inhalation Assessed by Long-Term Bone Marrow Culture. *Environ. Hlth. Perspect.* 104: 1277 – 1281.
- Baaron, K. Snyder, C.A. & Albert, R.E. 1984 Repeated Exposures of C57B1 Mice to 10 ppm Inhaled Benzene Markedly Depressed Erythropoietic Colony Formation. *Toxicol. Lett.* 20: 337 - 342.
- Banchereau, J. Briere, F. Caux, C. Davoust, J. Lebecque, S. Liu, Y. Pulendran, B. Palucka, K. 2000. Immunobiology of Dendritic Cells. *Annu. Rev. Immunol.* 18: 767 – 811.
- Barrera, M. Peralta, O. Madrid, V. 1995. Bases Moleculares de la Inmunología del Cáncer. *Salud Pública de Mexico.* Vol 37, No. 4: 344 – 353.
- Bick, R.L. 1993. Hematology: Clinical & Laboratory Practice, Vol I. U.K. Mosby-Book Year Inc.
- Birnbaum, L.S. Matthews, H.B. 1980. Disposition and Excretion of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuranil in the Rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 55: 342 - 352.
- Boje, H. Benkel, W. einiger, H.J. 1970. Untersuchugen zur Leukipose im Knochemmark der Ratte Nach Chronischer Benzol-inhalation. *Blut.* 21: 250 – 257.
- Boll, I.T. Domeyer, C. Bühner, C. 1997. Human Megakaryoblastic Proliferation and Differentiation Events Observed by Phase-Contrast Cinematography. *Acta Haematol.* 97:144 - 152.
- Callera, F. Falcao, R.P. 1997. Increased Apoptotic Cells in Bone Marrow Biopsies From Patients With Aplastic Anemia. *Br. J. Haematol.* 98: (1): 18 – 20.

- Cronkite, E.P. Drew, R.T. Inoue, T. And Bullis, J.E. 1985. Benzene Hematotoxicity and Leukemogenesis. *Am. J. Ind. Med.* 7: 447 - 456.
- Daniel W.W. 1983. Bioestadística (base para el análisis de las ciencias de la salud). 4ª Edición. LIMUSA. México.
- Dale, D.1998. Capítulo I. Evaluación de los Trastornos Hematológicos. En: Scientific American "Medicina, capítulo 14". Rubenstein, E: & Federman, D. Editors, Scientific American, New York.
- Dean, J.B. 1985. Recent Findings on the Genetic Toxicology of Benzene, Xylenes and Phenols. *Mut. Res.* 1985. 154: 153-181.
- Dobrokholov, V.B. 1972. The Mutagenic Influence of Benzene and Toluene Under Experimental Conditions. *Gig. Sanit.* 37: 36 -39.
- Donald, T. 1995. Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Scientific American SCI. & MED.* September/October.
- Dutcher, J.S. 1985. Effect of Vapor Concentration on the Disposition of Inhaled 2,3-Dichloropropene in Fisher-344 Rats. *Fundam. Appl. Toxicol.* 5: 997-1005.
- Farris G.M. Robinson S.N. Wong V.A. Hahn W.P. Shah R.S. 1997. Effects of Benzene on Splenic, Thymic, and Femoral Lymphocytes on Mice. *Toxicol.* 118: (2-3), 137-148.
- Farris, G.M. 1997. Benzene-Induced Hematotoxicity and Bone Marrow Compensation In B₆C₃F₁ Mice. *Fund. Appl. Toxicol.* 36: 119-129.
- Fernández, G.A. Vásquez, S. Fernández-Rañada J.M. 1985. Pancitopenias Aplásicas. *Medicine: Tratado De Medicina Práctica.* 1: (7): 23 - 40.

- Ferrairo, J.B. Lawler, G.C. Delo, J.R. & Laseter, J.L. 1985. Volatile Organic Pollulants In Biota and Sediments of Lake Ponchartrain. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 34: 246 - 255.
- Ferrer, V. Morales, M. Gómez, E. 1998. Anemia Aplástica. *Medicine (Programa de Formación Continua en Medicina Asistencial). Quinta serie. Volumen 13 (Enfermedades de la Sangre) No. I: 40 - 48.*
- García, T. 1997. *Fundamentos de Inmunobiología. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. Pp. 550*
- Gerarde, H.W. 1956. Toxicological Studies on Hydrocarbons. II a Comparative Study of The Effects of Benzene and Certain Mono-n-alkylbenzene on Hematopoiesis and Bone Marrow Metabolism in Rats. *Arch. Ind. Health.* 13: 468 - 477.
- Gerarde, H. & W. Ahlstrom, D.B. 1966. Toxicological Studies on Hydrocarbons XI. Influence of Dose on the Metabolism of Mono-n-alkyl Derivates of Bencene. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 9:185 - 190.
- Gill, D.P. Jenkins, V.K, Kempen, R.R. and Ellis, S. 1980. The Importance of Pluripotential Stem Cells in Benzene Toxicity. *Toxicol.* 16: 163 - 171.
- Goldstein, B.D. & Witz, G.1992. Benzene In: *Environmental Toxicants: Human Exposures and Their Health Effects.* Lippman, M. de Van Nostrand Reinhold. New York. Pp. 76 - 79.
- Hammening, D.M. 1990. *Clinical Hematology And Fundamentals of Hemostasis.* USA. F. A. Davis, Ed. Second Edition. U.S.A.
- Heimpel, H. and Heit, W. 1984. Aplastic Anemia: Pathogenesis and Clinical Aspects. In: *Pathology of the Bone Marrow.* Lennert, K. and Hübner, K. Eds. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart. p. 217 - 224.

- Henderson, R.F. 1996. Species Differences in the Metabolism of Benzene. *Environ. Hlth. Perspect.* 104: Suppl 6. 1173 – 1175.
- Henschler, R. Glatt, H.R. Heyworth, C.M. 1996. Hydroquinone Stimulates Granulocyte-Macrophage Progenitor Cells *in vitro* and *in vivo*. *Environ. Hlth. Perspect.* 104: 56; 1271 - 1274.
- Hillamn, 1977. S.R. & Finch, A.C. *Manual de Hematología. El Manual Moderno, México.*
- Hiromitsu Nakauchi et Gabriel Gachelin. 1993. Les Cellules Souches du Sang. *La Recherche (spécial: Le Sang).* 254 Mai. Volume 24. Page 537 – 541.
- Hoffbrand, A.V. & Pettit, J.E. 1993. *Essential Haematology.* Blackwell Scientific Publications. Third Edition, Oxford.
- Huff J. 1983 Technical Report on the Toxicology and Carcinogenesis Studies of Benzene (Cas No. 71-43-2) in F344/N Rats And B6c3f1 Mice (Gavage Studies). National Toxicology Program. NHI Publication. 84-2545. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service. National Institute of Health.U.S.A.
- Huff, J. 1983. National Toxicology Program. Technical Report on Toxicology and Carcinogenesis. Studies of Benzene (Cas No. 71-43-2) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Gavage Studies). Research Triangle Park, NC: Nat. Inst. Environ. Hlth. Sci.
- Humason, G.L. 1979. *Animal Tissue Techniques.* 4th Ed. W. H. Freeman And Co. San Francisco. Pp: 641 - 650.
- IARC 1982. Benzene. In: *Some Industrial Chemicals and Dyestuffs.* Lyon, International Agency For Research Of Cancer. P. 93 - 148. (Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemical to Humans). Vol 29.

- IPCS 1993. Identity, Physical and Chemical Properties, Analytical Methods. Environment. Hlth. Crit. 150 (Benzene). United Nations Environment Program, The International Labour Organization and the World Health Organization. Eds. Geneva. P. 19 - 31, 71.
- Irons, D.R. Heck, D.A. Moore, J.B. & Muirhead, K.A. 1979. Effects of Short-Term Benzene Administration on Bone Marrow Cell Cycle Kinetics in the Rats. Toxicol. Appl. Pharmacol. 51: 399 - 409.
- Koike, S. Kaun, i K. Sugimoto, H. 1959. Experimental Studies on Benzene Poisoning. Effect of Benzene on the Blood and Bone Marrow in Alvino Rats. Bull. Nat. Ins. Ind. Hlth. 2: 1 - 16.
- Laskin S. & Leong B.S. 1977. Experimental Benzene Intoxication. American Petroleum Institute. J. Toxicol. Environ. Health. Suppl. N° 2.
- Laveder, F. Marcolongo, R. 1996. Uncontrolled Triggering of Programmed Cell Death (Apoptosis) in Haematopoietic Stem Cells: A New Hypotesis for the Pathogenesis of Aplastic Anemia. Immunol. Cell. Biol. 74: (2): 159 - 162.
- Leong, B.S.1993. Effects on Laboratory Mammals *in vivo* and *in vitro* Test Systems. IPCS. Environ Health Criteria 150. Suppl. N° 1.
- Levine, R.F. 1981. Criteria For The Identification Of Megakaryocytes. In: Megakaryocyte Biology and Precursors: *in vitro* Cloning and Cellular Properties. Evatt, B.L., Levine, R.F. And Williams, N.T. Eds. Elsevier/North-Holland. New York. P. 203 - 215.
- Linnet, M.S. Yin, S.N., Travis, L.B. 1996. Clinical Features of Hematopoietic Malignancies and Related Disorders Among Benzene-Exposed Workers in China. Environ. Hlth. Perpect. 114, Supp 6: 1353 - 1364.

- Marsh, J.C. 1996. Long Term Bone Marrow Cultures in Aplastic Anemia. Eur. J. Haematol. Suppl. 60: 75 – 79.
- Medinsky, M.A. Sabourin, P.J. Henderson, R.F. Lucier, G.B. 1989. Differences In The Pathways for Metabolism of Benzene in Rats and Mice Simulated by a Physiological Model. Environ. Hlth. Perspect. 82: 43 - 49.
- Medinsky, M.A. Sabourin, P.J. Henderson, R.F. Lucier, G.B. 1989. A Physiological Model for Simulation of Benzene Metabolism by Rats and Mice. Toxicol. Appl. Pharmacol. 99: 193 - 206.
- Morales, P.M. Sánchez, V.E. Chávez, S.G. Guillén M.C. Gómez, M.E. Pizzuto, C.J. 1992. Avances en el Tratamiento de la Anemia Aplástica. Gaceta Médica de México. 128: (3): 237 - 225.
- Moreno Rodríguez José. 1996. Respuesta Inmune y Mecanismos de Autoinmunidad. Ed. Limusa, S. A. De C. V. Grupo Noriega Editores. México, D. F. Pp: 30,40.
- Nakeff, A. Daniels-Mcqueen, S. 1976. *In vitro* Colony Assay for a New Class of Megakaryocyte Precursor Colony- Forming Unit of Megakaryocyte. (CFU-M). Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 151: 587 -592.
- Neupogen: Monografía del producto. F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basilea, Suiza. I. MED. SGE – 1839/J.
- Philpott, N.J. Scopes, J. Marsh, J.C. Gordon-Smith, E.C. Gibson, F.M. 1995. Increased Apoptosis in Aplastic Anemia Bone Marrow Progenitor Cells: Possible Pathophysiologic Significance. Exp. Haematol. Dec. 23: (14): 1642 – 1648.
- Powers, P. 1995. Pathohematology. Cornell University Medical College. U.S.A.

- Ramsey J.C. Anderson M.E. 1984. A Physiologically Based Description of the Inhalation Pharmacokinetics of Styrene Monomer in Rats & Humans. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 73: 159 - 175.
- Ross, D. Siegel, D. Schettenberg, D.G. Xiaoming, M.S. & Moran, J.L. 1996. Cell-Specific Activation and Detoxification of Benzene Metabolites in Mouse and Human Bone Marrow: Identification of Target Cells and a Potential Role for Modulation of Apoptosis In Benzene Toxicity. *Environ. Hlth. Perspect.* 104: 1177-1182.
- Sabourin, P.J. Chen, B.T. Lucier G.B. Fisher E.H.1987. Effect of Dose on the Absortion and Excretion of ¹⁴C-Benzene Administred Orally or by Inhalation in Rats and Mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 87: 325 - 336.
- Scheding, D. Loeffler, M. Schmitz, S. Seidel, H-J. Wichman, E. 1992. Hematotoxic Effects of Benzene Analyzed by Mathematical Modeling. *Toxicology.* 72: 265 - 267.
- Simmons, A. 1980. *Technical Hematology.* 3rd Editon. J.B. Lippncott. Philadelphia. Pp.48-57.
- Snyder, C.A. et al. 1980. The Inhalation Toxicology of Benzene Incidence of Hematopoietic Neoplasms and Hematotoxicity in AKR/J and C57BL Mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 54: 323 – 331.
- Snyder, C.A. Goldstein, B.D. Sellakumar, A. et al. 1978b. Hematotoxicity of Inhaled Benzene to Sprague Dawley Rats and AKR/J At 300 ppm. *J. Toxicol. Environ. Hlth.* 4: 605 - 618.
- Stewart, L.S. 1992. Bone Marrow Transplants. *MBT Newsletters.* USA. <http://Www.nysernet.org/bcic/bmt/bmt.book/acknowledgements.html>
- Tapia, A.R., Villegas, F.P. Islas, C.E. Betancourt, R.M. Vega, A.E. y Velasco, L.R. 1990. Identificación de Proteínas con Actividad Megacariopoyética *in vivo* e *in vitro* en la Orina de Pacientes con Alteraciones Plaquetarias. *Bioquimia, Supl.* 15: 98.

- Tavassoli, M. 1991. Structure and Functions of The Spleen. In: Hematology 4th Edition. Williams, J.W. Beutler, E. Erslev, A.J. and Lichtman, M.A. Eds. McGraw-Hill Publishing Company. New York. Pp. 54 - 62.
- Teramura, M. & Mizoguchi, H. 1996. Special education: Aplastic Anemia. *Oncologist*. 1 (3): 187 – 189.
- Thomas R.D. 1986. Drinking Water and Health. Vol 6. National Academy Press, Washington, D.C. USA.
- Tice, R.R. Luke, C.A. & Drew, R.T. 1989. Effect of Exposure Route, Regime, and Duration of Benzene-Induced Genotoxic and Cytotoxic Bone Marrow Damage in Mice. *Environ. Health Perspect.* 82: 65 - 74.
- Till, J.E. & McCulloch, E.A. 1961. A Direct Measurement of the Radiation Sensitivity of Normal Mouse Bone Marrow Cells. *Radiat. Res.* 14: 213 – 220
- Wallace, L. 1996. Environmental Exposure to Benzene: An Update. *Environ. Health Perspect.* 104: 1129 – 1136
- Wanner, H.V. 1993. Sources of Pollutants in Indoor Air. In: *Environ. Carcinog. Methods of Anal. and Exp. Measur.* Vol. 12. Seifert, B. Van de Wiel. Stuttgart.
- Ward, C.O. Kuna, R.A. Snyder, N.K. Alsaker, R.D. Coate, W.B. & Craig, P.H. 1985. Subchronic Inhalation Toxicity of Benzene in Rats and Mice. *Am. J. Ind. Med.* 7: 457.
- Williams, J.G., Beutler, E. Erslev A.J. Lichtman, M.A. 1990. Hematology. McGraw Hill Inc. Fourth Edition. New York.
- Woo, L.W. Johnson, T.J. Garner, D.C. 1989. Inhibitory Effects of Benzene Metabolites on Nuclear DNA Synthesis in Bone Marrow Cells. *J Toxicol. Environ. Health.* 26: 277 - 291.

Yin, S.N. Li, G.L. Hu, Y.T. Garner, D.C. 1989. Inhibitory Effects of Benzene Metabolites on Nuclear DNA Synthesis in Bone Marrow Cells. *J. Toxicol. Environ. Hlth.* 26: 277 – 291.

Young, N.S., Maciejewski, M. 1997. The Pathophysiology of Acquired Aplastic Anemia. *N. Eng. J. Med.* 336: (19): 1365 - 1372.

APÉNDICE (TÉCNICAS)

a) HEMOGLOBINA.

Diluyente de Drabkin:

Ferricianuro de potasio	200 mg
Cianuro de potasio	50 mg
Bicarbonato de sodio	1 g

Disolver y aforar a 1000 ml con agua destilada.

TÉCNICA:

En un tubo de ensaye de 13 X 100 mm colocar:

5 mL diluyente de Drabkin

0.020 de ml de sangre homogeneizada

Mezclar por inversión y dejar reposar 10 - 20 min.

Leer en espectrofotómetro a 540 nm, ajustando a cero de absorbancia con el diluyente de Drabkin.

Obtención de la concentración de Hb:

Obtener el factor $F = \text{Conc. St./D.O. St.}$

$\text{Conc. de Hb} = \text{Factor} \times \text{D.O. Problema (g/\%)}$.

*Conociendo el valor total de hemoglobina y la concentración de eritrocitos, se obtiene:

HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MEDIA. que valora el peso medio de la hemoglobina contenida en los eritrocitos en valor absoluto.

$$\text{H.C.M} = \frac{\text{hemoglobina} \times 10}{\text{número de eritrocitos}} = \mu\text{g}$$

b) HEMATOCRITO.

Se llena el tubo capilar hasta dos terceras partes con sangre perfectamente mezclada, se sella al fuego por un extremo y se centrifuga durante 30 min a 3500 r.p.m.

La concentración del hematócrito se obtiene utilizando un disco lector.

*Conociendo el valor total del hematocrito y la concentración de eritrocitos, se obtiene:

VOLUMEN CORPUSCULAR MEDIO. Que representa el volumen celular medido de los eritrocitos en valor absoluto.

$$\text{V.C.M} = \frac{\text{hematócrito} \times 10}{\text{número de eritrocitos}} = \text{fl}$$

c) RECUENTO DE ERITROCITOS.

Solución de Gower:

Sulfato sódico	12.5 g
Ácido acético glacial	33.3 mL
Agua destilada	cbp 200 mL

Mezclar y filtrar antes de su empleo.

TÉCNICA:

- Aspirar la sangre con una pipeta para glóbulos rojos hasta la marca 0.5
- Aforar con la solución diluyente hasta la marca 101.
- Agitar la pipeta 3 minutos.
- Eliminar tres o cuatro gotas del contenido de la pipeta y cargue la cámara de Neubauer.
- Esperar 2 - 3 min.
- Contar en la cuadrícula central del hemocitómetro con objetivo de 40x.

Multiplíquese el resultado por 10,000 y así obtendrá el número de eritrocitos presentes en un milímetro cúbico.

d)CONCENTRACIÓN DE HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MEDIA.

Una vez conocidos los valores de hemoglobina total y hematocrito, se obtiene C.H.C.M., que mide la concentración media de la hemoglobina en los eritrocitos, en valor absoluto, se obtiene:

$$\text{H.C.M} = \frac{\text{hemoglobina} \times 100}{\text{hematócrito}} = \quad \%$$

e) RECUENTO DE RETICULOCITOS.

Nuevo azul de metileno	1.0 g.
Citrato de sodio	0.4 g.
Solución salina	cpb 100 ml.

TECNICA.

- Colocar 6 gotas de sangre completa en un tubo de ensaye de 8 X 75 mm.
- Agregar 6 gotas del colorante para reticulocitos y mezclar.
- Incubar durante 30 min. a 37°C.
- Decantar el sobrenadante, con el sedimento hacer un frotis y dejarlo secar.
- Observar al microscopio con objetivo de inmersión y contar los reticulocitos que se encuentren por cada 1000 eritrocitos.

f) RECuento DE PLAQUETAS.

Oxalato de amonio	1 g
Agua destilada	cpb 100 ml

Mezclar, filtrar antes de su uso y conservar a 4 °C.

TÉCNICA:

- Cargar de sangre la pipeta hasta la marca 0.5
- Llenar con el oxalato de amonio hasta la marca 11.
- Agitar la pipeta aproximadamente 3 minutos.
- Desechar las 4 primeras gotas y cargar la cámara de Neubauer.
- Colocar la cámara en una caja Petri con ambiente húmedo y dejar reposar 10 min.
- Hacer la cuenta de plaquetas en la parte central de la cuadrícula, considerando únicamente cinco cuadros pequeños.
- El número de plaquetas observadas se multiplica por 1000 para conocer la cantidad total de plaquetas por milímetro cúbico.

g) RECuento DE LEUCOCITOS TOTALES.

Diluyente de Turk	
Acido acético glacial	5 ml
Agua destilada,	cbp 100 ml

Agregar una pizca de cristal violeta, mezclar.

TÉCNICA:

- Aspirar con una pipeta cuenta glóbulos blancos sangre homogeneizada hasta la marca 0.5.
- Aforar con el líquido diluyente hasta la marca 11.
- Agitar la pipeta 90 seg .
- Eliminar cuatro o cinco gotas del contenido de la pipeta y cargar la cámara de Neubauer .
- Esperar 10 min y contar las células de los cuadros grandes de las esquinas del cuadrulado de la cámara. Multiplicar el resultado por 50 y así obtendrá el número de leucocitos presentes en un milímetro cúbico.

h) CUENTA DIFERENCIAL DE LEUCOCITOS.

Colorante de Wright:

Colorante de Wright	2 g
Glicerina q.p	30 ml
Metanol	cbp 1000 ml

Solución amortiguadora para el colorante de Wright

Fosfato monobásico de potasio	6.63 g
Fosfato dibásico de sodio	2.56 g

Aforar a 1000 ml con agua destilada.

TÉCNICA.

Hacer un extendido de sangre y dejarlo secar.

- La preparación se cubre con el colorante de Wright durante 3 min.
- Se escurre el exceso de colorante y se cubre con la solución amortiguadora por 3 min.
- Escurrir el excedente de solución amortiguadora y dejar secar a temperatura ambiente.
- Para la identificación microscópica se pueden utilizar los objetivos de 40X ó 100 X.
- Registrar las diferentes formas de leucocitos en un total de 100 glóbulos blancos.

i) RECuento DE CÉLULAS NUCLEADAS DE MÉDULA ÓSEA FEMORAL

Diluyente de Turk

Acido acético glacial	5 ml
Agua destilada,	cbp 100 ml

Agregar una pizca de azul de metileno, mezclar.

TÉCNICA:

- Disectar el fémur izquierdo de una rata o ratón.
- Eliminar el exceso de tejido muscular y conectivo.
- Retirar ambas epífisis
- Perfundir el canal medular con ayuda de una aguja de acero 21" x 32"
- Inyectar por el canal medular 3 ml de solución salina fisiológica
- Homogenizar el contenido medular y aspirar médula ósea perfundida con la pipeta cuenta glóbulos blancos hasta la marca 0.5.
- Aforar con diluyente de Turk hasta la marca 11.
- Agitar la pipeta 90 seg .
- Eliminar cuatro o cinco gotas del contenido de la pipeta y cargar la cámara de Neubauer .

- Esperar 10 min y contar las células de los cuadros grandes de las esquinas del cuadrulado de la cámara. Multiplique el resultado por 50.

J) CUENTA DIFERENCIAL DE MÉDULA ÓSEA.

TÉCNICA.

-Preparación del extendido de médula ósea.- Se debe hacer inmediatamente o bien después de agregar heparina, oxalacetato o la sal sódica o dipotásica de EDTA a la médula aspirada.

-Se procede de la misma forma que para la de sangre. Las unidades de médula pueden identificarse y pasarse a una laminilla para frotis mediante el uso de un tubo capilar

-Tinción.- Si no es posible hacer la tinción inmediatamente, fijar el frotis con unas cuantas gotas de metanol. Colocar la laminilla sobre una gradilla, cubriéndola después con 8 ó 10 gotas de colorante de Wright. Escurrir el colorante, agregar 20 gotas de colorante de Giemsa diluido (una gota de colorante de Giemsa por 15 gotas de agua amortiguada a un pH de 6.4) y dejar actuar durante 15 minutos.

-Los frotis de médula ósea se pueden teñir con Giemsa de 5 a 15 minutos, de acuerdo con las necesidades del trabajo.

- Para la identificación microscópica se observan los frotis con el objetivo 100 X.

K) PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO DE ÓRGANOS O TEJIDOS.

Fijación.

- Reactivos

- Solución fijadora de Bouin:

-Ácido pícrico 1.2% p/v en agua desionizada 75 ml

- Formol concentrado 25 ml

-Ácido acético glacial concentrado 5 ml

- Colocar la muestra en un volumen 20 veces mayor de solución fijadora de Bouin durante 7 días.

Deshidratación, aclaramiento, inclusión.

Reactivos:

- Etanol 80% 250 ml

- Etanol 96% 250 ml

- Etanol absoluto (100%) 250 ml

- Etanol-Xileno (50%v/v) 250 ml

- Xileno absoluto	250 ml
- Parafina (punto ebullición 60 °C)	500 ml
- Parafina-cera de abeja (50% p/p)	500 ml

TÉCNICA.

- Retirar del tejido de interés el exceso de solución fijadora.
- Colocar el tejido durante 30 minutos en etanol al 80% (2veces)
- Retirar el etanol al 80%
- Colocar el tejido durante 30 minutos en etanol al 96% (3 veces)
- Retirar el etanol al 96%
- Colocar el tejido durante 30 minutos en etanol absoluto (2 veces)
- Retirar el etanol absoluto
- Colocar el tejido durante 30 minutos en la solución de etanol-xileno
- Retirar la solución etanol-xileno
- Colocar el tejido en xileno absoluto durante 30 minutos (2 veces)
- Retirar el xileno absoluto
- Colocar el tejido durante 60 minutos en Parafina a 60 °C (2 veces)
- Retirar la parafina a 60 °C
- Incluir el tejido en parafina-cera de abeja (60 °C)
- Dejar solidificar los bloques de inclusión de parafina-cera de abeja
- Una vez solidificados los bloques de inclusión, se procede a realizar los cortes con ayuda de un microtomo, el espesor del corte (6 µm) depende de las necesidades de la técnica por realizar.
- Fijar los cortes en portaobjetos con gelatina USV para su posterior tinción.

Tinción Hematoxilina-Eosina.

Ractivos:

- Xileno absoluto	500 ml
- Etanol-Xileno (50% v/v)	250 ml
- Etanol absoluto	500 ml
- Etanol-Eter (50%v/v)	250 ml
- Etanol 96%	250 ml
- Etanol 80%	250 ml
- Etanol 60%	250 ml
- Agua desionizada	500 ml
- Hematoxilina de Harris	250 ml
- Agua corriente	500 ml

- Alcohol ácido 250 ml
- Agua destilada 250 ml
- Solución Scott 250 ml

(Bicarbonato de sodio o potasio 2.75 g, Sulfato de magnesio 20 g, aforar a 1000 ml con agua desionizada)

- Eosina 250 ml

TÉCNICA.

- Realizar un tren de tinción como se indica a continuación:
- Colocar los portaobjetos en:
 - Xileno I 5 minutos
 - Xileno II 5 minutos
 - Etanol-Xileno 3 minutos
 - Etanol absoluto I 2 minutos
 - Etanol absoluto II 2 minutos
 - Etanol-Eter 2 minutos
 - Etanol 96% 2 minutos
 - Etanol 80% 2 minutos
 - Etanol 60% 2 minutos
 - Agua desionizada 3 minutos
 - Hematoxilina de Harris 5 minutos
 - Agua corriente 10 segundos
 - Alcohol ácido 10 segundos
 - Agua destilada 10 segundos
 - Solución Scott 30 segundos
 - Agua destilada 1 minuto
 - Eosina 2 minutos
 - Etanol 96% 10 segundos (2 veces)
 - Etanol absoluto 10 segundos (2 veces)
 - Etanol-Xileno 10 segundos
 - Xileno absoluto 10 segundos (2 veces)
- Dejar secar las preparaciones
- Montar las preparaciones con ayuda de un cubreobjetos y resina sintética (Entellan)
- Observar por microscopía en campo claro.