

Efectos adversos de Doxorrubicina sobre la Granulopoyesis en murinos

Lilian Barrios, Oscar H. Poletti (*)

Antecedentes

La doxorrubicina, antibiótico del grupo de las antraciclinas producido por el *Streptococo peucetis* variedad *caesius*, posee efecto antineoplásico. Por sus propiedades antineoplásicas es empleado en protocolos terapéuticos en pacientes con carcinoma gástrico⁽¹⁾ y de mama⁽²⁾, entre otros. Como otras drogas antineoplásicas, la doxorrubicina posee efectos adversos sobre varios tejidos, que limitan la dosis y duración de los ciclos de su aplicación. Si bien un efecto adverso señalado como muy importante consiste en la toxicidad cardíaca que puede manifestarse en forma aguda, subaguda o crónica^(3, 4), la mielosupresión es otro efecto colateral no deseado descrito en los pacientes que reciben esta droga^(5, 6). En el presente trabajo hemos investigado el efecto de una única dosis de 7 mg/kg de peso (21 mg/m²) de doxorrubicina sobre la granulopoyesis de murinos en un ciclo de estudio de 20 días. Se evaluaron: el número de neutrófilos periféricos, la población granulocítica medular y esplénica y el contenido de unidades formadoras de colonias de granulocitos – macrófagos (GM-CFU) de fémur y bazo. El factor estimulante de colonias de granulocitos recombinante humano, (rhG-CSF), fue administrado para estudiar la capacidad funcional de los tejidos granulopoyéticos de los animales pretratados con doxorrubicina, dado el potente efecto estimulante de la granulopoyesis de este factor de crecimiento hemopoyético⁽⁷⁾.

Material y Métodos

Animales: se usaron ratones hembras adultos CF1 de 3 meses de edad con 25 a 30 g de peso corporal.

Doxorrubicina: (Dox; Doxorrubicina de laboratorios Filaxis). La droga fue disuelta en 30 µl de agua destilada y administrada a todos los animales en dosis de 7 mg/kg/ratón

(21 mg/m²), en la vena de la cola el día 0 de un ciclo de 20 días de estudio.

Factor estimulante de colonias de granulocitos recombinante humano (rhG-CSF): Laboratorios Roche: 5 viales conteniendo cada uno: 30 millones de unidades = 300 µg de rhG-CSF. Antes de las inyecciones, la solución que contiene el rhG-CSF fue diluida con buffer salino de fosfato (pH 7.4) conteniendo 0,1% de albúmina bovina sérica. Animales pretratados con 7 mg/kg de doxorrubicina el día 0, fueron inyectados con 30 µg/kg/día de rhG-CSF, vía sc, en un volumen de 100 µl/ratón desde el día 1 (24 horas después de la administración de la droga antineoplásica) hasta día 20. Animales control recibieron una dosis equivalente de solución diluyente. Lotes de 12 animales (6 animales problema y 6 animales control) se sacrificaron a los 0, 4, 8, 12, 16 y 20 días.

Hematocrito: se determinó mediante capilares heparinizados

Contajes celulares: los leucocitos periféricos/mm³ se contaron en hemocitómetro de Neubauer, mediante extracción de 200 µl de sangre por punción cardíaca. Las células de médula ósea /mg fueron obtenidas del fémur izquierdo, homogenizadas, y contadas en hemocitómetro standard. El valor de las células se expresa por médula ósea total asumiendo que el fémur contiene el 6% del tejido medular⁽⁸⁾. Las células del fémur derecho fueron empleadas para realizar un frotis para el estudio del medulograma. Las células de bazo/mg se obtuvieron mediante el procesamiento de un trozo de bazo (previamente pesado en balanza de precisión), con homogenador de vidrio y contadas con igual método que las células de médula ósea. El remanente de tejido esplénico fue empleado para realizar un frotis para el estudio de las poblaciones de células linfocítica, granulocítica y eritroide del bazo.

Morfología celular: fue evaluada en sangre periférica, médula ósea y bazo mediante frotis teñidos con May Grünwald-Giemsa.

Determinación de células progenitoras: el número de células progenitoras GM-CFU (unidad formadora de colonias de granulocitos – macrófagos) fue determinado por el método

(*) Departamento de Ciencias Básicas. Cátedra I de Fisiología Humana. Facultad de Medicina. UNNE.

de cultivo en medio semisólido de metilcelulosa de Iscove y Sieber⁽⁹⁾. El cultivo de GM-CFU fue suplementado con 20% de medio condicionante de bazo de rata estimulado con mitógeno de fitolaca. El cultivo se incubó en estufa a 37 °C en ambiente humificado con 5% de CO₂ y 5% de O₂ en nitrógeno por 8 días. El número de colonias se contó en microscopio invertido Olympus y el número de progenitores se estimó por número de células nucleadas por mg de médula ósea femoral o bazo, respectivamente. Los resultados se expresan como porcentaje de cambio con relación a los valores hallados en el animal normal

Análisis estadístico: se realizó en el Software Instat (Graph Pad). Los datos se analizaron mediante ANOVA y el Test de comparaciones múltiples de Student – Neuman – Keuls. Los datos son expresados como valor promedio \pm un error standard y se consideró significativa una $p < .05$.

Resultados

• Efecto de la administración de doxorubicina sobre los neutrófilos periféricos en murinos

Llamativamente, en los animales a los cuales se administró doxorubicina sola, no se observó disminución de los neutrófilos circulantes con respecto a los valores normales hallándose en cambio un aumento, aunque no significativo de estas células el día 12 del experimento. En los lotes de

animales que fueron tratados con rhG-CSF el número de polimorfonucleares neutrófilos aumentó en forma significativa durante los días 12 a 16 comparado tanto con el lote control de ratones pretratados con doxorubicina inyectados con diluyente, como con los valores hallado en animales normales (Fig. 1).

• Efecto de la administración de doxorubicina sobre el compartimento granulocítico de médula ósea en murinos.

Como puede observarse en la Fig. 2, la administración de doxorubicina no produjo cambios sobre el contenido de células precursoras granulocíticas medulares salvo en el día 16 en que se observó un aumento significativo, comparado con el valor hallado en animales normales. En tanto que, a diferencia de lo que sucede en ratones normales que aumentan su compartimento granulopoyético medular, no se observaron cambios significativos en los lotes de ratones pretratados con doxorubicina, que recibieron inyecciones de rhG-CSF en dosis de 30 μ g/kg/día desde el día 1 hasta el fin del experimento,

• Efecto de la administración de doxorubicina sobre el compartimento granulocítico esplénico en murinos

El compartimento de células granulocíticas esplénicas (Fig. 3) no mostró cambios por efecto de la administración de la droga antineoplásica doxorubicina. Sin embargo, a

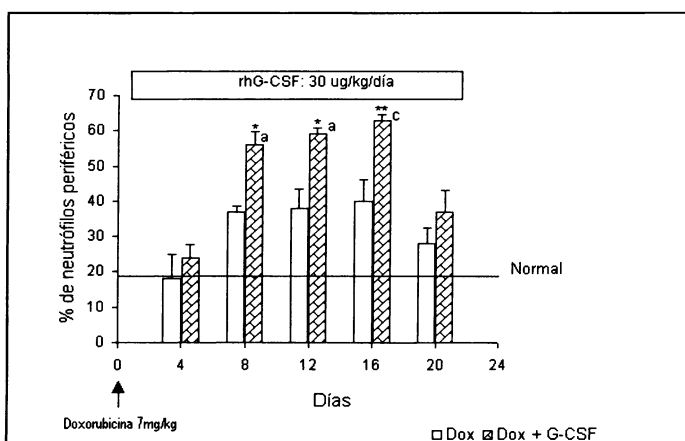


Fig. 1: Efecto de la administración de 7 mg/kg/ratón de doxorubicina, el día 0 (Dox – columnas blancas) y de 30 μ g/kg/ratón de rhG-CSF inyectados diariamente durante los días 1 a 20 a los ratones pretratados con 7 mg/kg/ratón de doxorubicina (Dox + G-CSF – columnas de líneas cortadas), sobre el número de neutrófilos periféricos \times mm³. Los puntos expresan el valor promedio \pm 1 error standard. (***) Estadísticamente significativo con respecto al valor control del mismo día $p < .001$; (*) $p < .05$. (a) Estadísticamente significativo con respecto al valor normal: $p < .001$; (c): $p < .05$

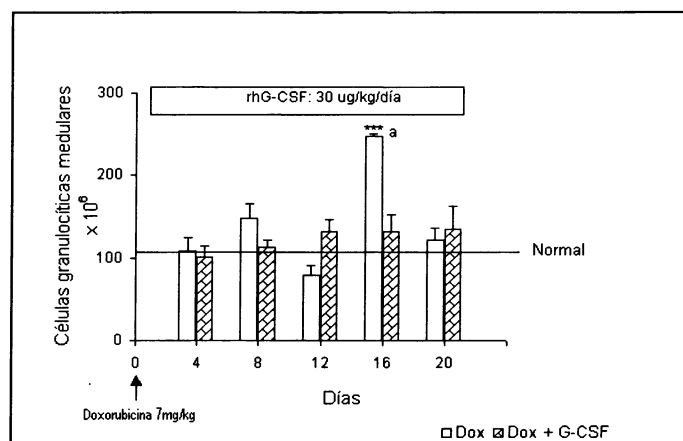


Fig. 2: Efecto de la administración de 7 mg/kg/ratón de doxorubicina, el día 0 (Dox – columnas blancas) y de 30 μ g/kg/ratón de rhG-CSF inyectados diariamente durante los días 1 a 20 a los ratones pretratados con 7 mg/kg/ratón de doxorubicina (Dox + G-CSF – columnas de líneas cortadas), sobre el número de células precursoras granulocíticas de médula ósea $\times 10^6$. Los puntos expresan el valor promedio \pm 1 error standard. (a): estadísticamente significativo comparado con el valor normal (0 horas) $p < .001$.

diferencia de lo observado en médula ósea, la administración de rhG-CSF estimuló la proliferación de células granulocíticas en los animales que previamente habían recibido doxorubicina, observándose un incremento significativo de las mismas el día 16 comparado tanto con los valores del lote control del mismo día como con los valores normales, en tanto que en el día 20 si bien hubo un aumento de las células precursoras granulocíticas comparado con los valores hallados en animales normales, este valor no fue significativamente diferente del lote control del mismo día.

• *Efecto de la administración de doxorubicina sobre la población de células progenitoras GM-CFU a nivel medular femoral*

Como puede observarse en Fig. 4 la administración de doxorubicina tuvo un efecto bifásico sobre la población de GM-CFUs femorales. En los ratones que recibieron 7 mg/kg/ratón de doxorubicina el día 0 del experimento, un aumento significativo del número de GM-CFUs femorales durante los días 4 a 8 fue seguido por un descenso del número de estas células progenitoras el día 12 (aunque no significativo), y luego un nuevo aumento fue observado entre los días 16 a 20. En cambio los animales pretratados con doxorubicina que recibieron diariamente 30 μ g/kg de G-CSF muestran valores normales del número de GM-CFUs hasta el día 12, y luego un aumento significativo entre los días 16 a 20, com-

parado tanto con el lote control del mismo día como con los valores normales. El día 4 del experimento, el contenido de GM-CFUs femorales fue estadísticamente menor en estos animales que en el lote control del mismo día

• *Efecto de la administración de doxorubicina sobre el comportamiento de GM-CFUs esplénicas.*

La Fig. 5 nos muestra que la administración de 7 mg/kg de doxorubicina aumentó en forma importante pero transitoria el número de GM-CFUs de bazo el día 16 del experimento, siendo su valor similar a los hallados en animales normales en el resto de días estudiados.

En los animales pretratados con doxorubicina que recibieron 30 μ g/kg /día de G-CSF, en tanto, se observó un aumento sostenido del número de GM-CFUs desde el día 12 a 20, comparado tanto con el lote control del mismo día como con los valores normales

Discusión

Una de las formas de aplicación de la doxorubicina como droga terapéutica antineoplásica es su administración mediante dosis acumulativas. Hay descriptos protocolos^(5, 10) donde su aplicación se realiza en dosis que varían entre 16,8 mg/m² por semana a 25 mg/m² los días 1 y 8 del ciclo

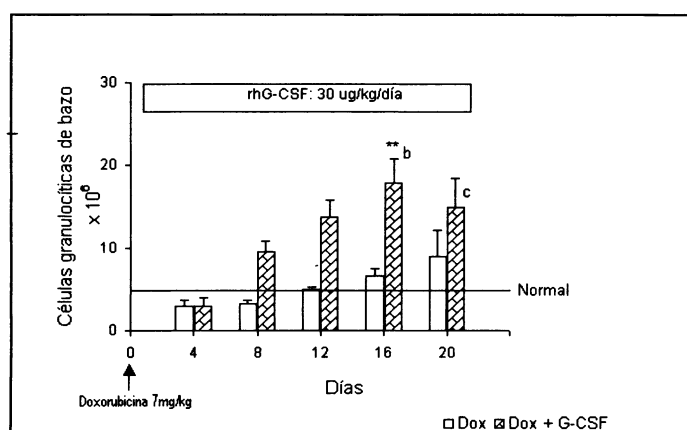


Fig. 3: Efecto de la administración de 7 mg/kg/ratón de doxorubicina, el día 0 (Dox – columnas blancas) y de 30 μ g/kg/ratón de rhG-CSF inyectados diariamente durante los días 1 a 20 a los ratones pretratados con 7 mg/kg/ratón de doxorubicina (Dox + G-CSF– columnas de líneas cortadas), sobre el número de células granulocíticas de bazo $\times 10^6$. Los puntos expresan el valor promedio ± 1 error standard. (a): estadísticamente significativo comparado con el valor normal (0 horas) $p < .001$. (**). Estadísticamente significativo con respecto al valor control del mismo día $p < .01$; (*) $p < .05$. (b) Estadísticamente significativo con respecto al valor normal: $p < .01$; (c): $p < .05$

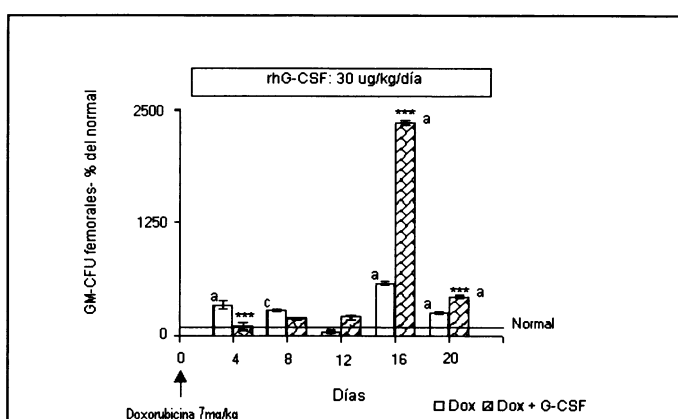


Fig. 4: Porcentaje de cambio (comparado con los valores normales) de GM-CFUs medulares femorales tras la administración de 7 mg/kg/ratón de doxorubicina (Dox – Columnas blancas) y de 30 μ g/kg/ratón de rhG-CSF inyectados diariamente durante los días 1 a 20 a los ratones pretratados con 7 mg/kg/ratón de doxorubicina (Dox + G-CSF– columnas de líneas cortadas). (***). Estadísticamente significativo con respecto al valor control del mismo día $p < .001$. (a) Estadísticamente significativo con respecto al valor normal: $p < .001$; (c): $p < .05$

cada 3 semanas, entre otros. En el presente trabajo hemos investigado los efectos adversos sobre la granulopoyesis producidos por una única dosis de 7mg/kg (21 mg/m²) de doxorubicina en murinos. Si bien se describe a la mielodepresión y neutropenia como posibles efectos adversos de esta droga quimioterápica^(11,12), su preciso mecanismo de acción sobre la hematopoyesis no está claro, ya que habitualmente la doxorubicina es administrada como parte de un protocolo terapéutico con uno o más drogas antineoplásicas y no en forma individual. Nuestros resultados indican que, aún a dosis bajas como las que inicialmente se aplican al iniciar un esquema acumulativo, esta droga produce efecto sobre la granulopoyesis. Si bien estas dosis no producen leucopenia, sí afectan la capacidad de proliferación y maduración del compartimento de células precursoras granulocíticas femorales, ya que los animales pretratados con doxorubicina son incapaces de aumentar la granulopoyesis en médula ósea cuando son tratados diariamente con rhG-CSF, factor de crecimiento hematopoyético que incrementa significativamente este compartimento celular en la médula femoral de animales normales⁽¹³⁾. Este efecto podría determinar que, ante la entrada de agentes bacterianos al organismo, el sistema hematopoyético tuviera una menor capacidad de respuesta para desencadenar los mecanismos de defensa pertinentes. La administración de doxorubicina, por otro lado, afecta a

la población de GM-CFUs de médula femoral produciendo un aumento inicial de su número seguido por una disminución, lo cual sería compatible con la migración de estas células progenitoras medulares al bazo, efecto coincidente con el producido por otros agentes quimioterapéuticos^(14,15). El mantenimiento de la capacidad de proliferación de las GM-CFUs observado tanto a nivel de médula ósea como del bazo en los animales pretratados con doxorubicina, estaría indicando que el efecto granulopoyético adverso de doxorubicina podría producirse a nivel de la capacidad de maduración y diferenciación de estas células para dar lugar a células precursoras más maduras (mieloblastos a metamielocitos neutrófilos), lo que explicaría la falta de efecto estimulante del tratamiento con rhG-CSF sobre el compartimento de células granulocíticas femorales. Podría sugerirse también que esta droga quimioterápica podría ejercer un efecto inhibitorio sobre el microambiente medular ya que el bazo es capaz de responder a la administración de rhG-CSF aumentando el número de células precursoras granulocíticas. Finalmente es de señalar que si bien en el animal tratado con una única dosis de 7 mg/kg de doxorubicina ya no se observan efectos (salvo un aumento de las GM-CFUs femorales) luego de 20 días de su aplicación, sí se hacen evidentes efectos residuales de la droga sobre la granulopoyesis de los animales cuando estos son tratados con un factor estimulante hematopoyético como el rhG-CSF. Adicionalmente, se hacen necesarios estudios con aplicación de mayor número de dosis de esta droga para averiguar si se suman efectos de dichas aplicaciones sobre el proceso de granulopoyesis.

Agradecimientos

Nuestro agradecimiento al señor Salvador E. Falcón por su asistencia técnica.

Bibliografía

1. Wadler S, Brain C, Catalano P, Einzig AI, Cella D, Benson AB 3rd. Randomized phase II trial of either fluorouracil, parenteral hydroxyurea, interferon- α -2a, and filgrastim or doxorubicin/docetaxel in patients with advanced gastric cancer with quality-of-life assessment: Eastern Cooperative Oncology Group Study E6296. *Cancer J*. 2002;8:282-286.
2. Baltali E, Altundag MK, Ozisik Y, Firat D, Barab I, Tekuzman G.. Paclitaxel and doxorubicin combination in the first-line treatment of metastatic breast cancer- *Tumori* 2002, 88: 200 - 3.
3. Saeki K, Obi I, Ogiku N, Shigekawa M, Imagawa T, Matsumoto T. Doxorubicin directly bind to the cardiac-type ryanodine receptor. *Life Sci* 2002;70:2377-2389.
4. Barnabe N, Zastre JA, Venkataram S, Hasinoff BB. Deferiprone protects against doxorubicin-induced myocyte cytotoxicity. *Free Radic Biol Med* 2002 15;33 : 266-275.

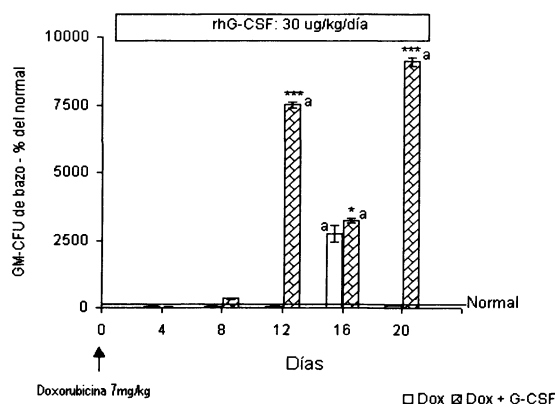


Fig. 5: Porcentaje de cambio (comparado con los valores normales) de GM-CFUs esplénicas tras la administración de 7 mg/kg/ratón de doxorubicina (Dox - Columnas blancas) y de 30 μ g/kg/ratón de rhG-CSF inyectados diariamente durante los días 1 a 20 a los ratones pretratados con 7 mg/kg/ratón de doxorubicina (Dox + G-CSF- columnas de líneas cortadas). (***) Estadísticamente significativo con respecto al valor control del mismo día $p < .001$. (a) Estadísticamente significativo con respecto al valor normal: $p < .001$; (c): $p < .05$

5. Ellis GK, Livingston RB, Gralow JR, Green SJ, Thompson T. Dose-dense anthracycline-based chemotherapy for node-positive breast cancer. *J Clin Oncol* 2002; 20:3637-3643.
6. Weiss AJ, Lackman RD. A comparison of human G-CSF and human GM-CSF given concurrently with anti-cancer chemotherapy. *Oncol Rep* 2002;9:945-950.
7. Barrios L, Agustini MI, Poletti OH, Juaristi C, Brandan N. Effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF) on murine bone marrow and spleen erythropoiesis. *APPTLA* 1998; 48: 18 - 24.
8. Wichmann HE, Loeffler M. Mathematical modeling of cell proliferation. *Stem cell regulation in hemopoiesis* (vol 1,2). Boca Raton, FL, CRC, 1985.
9. Iscove NN, Sieber F. Erythroid progenitors in mouse bone marrow detected by macroscopic colony formation in culture. *Exp Hematol* 1975; 3: 32-43.
10. Pawlicki M, Rolski J, Zaluski J, Siedlecki P, Ramlau C, Tomzak P. A phase II study of intravenous navelbine and doxorubicin combination in previously untreated advanced breast carcinoma. *Oncologist* 2002;7:205-209.
11. Papandreou CN, Daliani DD, Thall PF, Tu SM, Wang X, Reyes A, Troncoso P, Logothetis CJ. Results of a phase II study with doxorubicin, etoposide, and cisplatin in patients with fully characterized small-cell carcinoma of the prostate. *J Clin Oncol* 2002;20:3072-3080.
12. Okuno SH, Mailliard JA, Suman VJ, Edmonson JH, Creagan ET, Nair S, Levitt R, Kugler JW. Phase II study of methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin in patients with squamous cell carcinoma of the upper respiratory or alimentary passages of the head and neck. *Cancer* 2002;94:2224-2231.
13. Lord BI, Molineaux G, Pojda Z, Souza LM, Mermod JJ, Dexter TM. Myeloid cell kinetics in mice treated with recombinant interleukin-3, granulocyte colony-stimulating (CSF), or granulocyte-macrophage CSF in vivo. *Blood* 1991; 77: 2154 -2159.
14. Goris H, Bungart B, Loeffler M, Schmitz S, Nijhof W. Migration of stem cells and progenitors between marrow and spleen following thiamphenicol treatment of mice. *Exp Hematol* 1990; 18: 400 - 407.
15. Barrios L, Poletti OH and Agustini MI. The influence of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on granulopoiesis in mice recovering from cyclophosphamide treatment. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2000; 22: 275 - 280.