

ERITROPOYESIS Y ESPLENECTOMÍA EN UN MODELO MURINO

ERITHROPOIESIS AND SPLENECTOMY IN A MURINE MODEL

CECILIA D'ANNA, CHRISTIAN GATTI, TANIA VEUTHEY, MARIANELA SÁNCHEZ, MARTA ROQUE.

Laboratorio de Fisiología Humana. Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional del Sur. Bahía Blanca. Argentina.

RESUMEN

Introducción: El bazo del ratón adulto participa en la recuperación del eritrón porque su estroma aporta un microentorno adecuado para la proliferación y maduración de progenitores. **Objetivo:** Evaluar por estudios morfológicos el grado de eritropoyesis hepática y renal en ratones esplenectomizados en respuesta a la hemólisis inducida por fenilhidrazina (FHZ). **Materiales y Métodos:** Ratones hembra CF1(30±3g) fueron agrupados en: 1) **GRUPO CONTROL (GC)**(n=18): solución fisiológica (SF) intraperitoneal (ip) (300µL;días:0,2) postcirugía simulada; 2) **GRUPO ANÉMICO (GA)** (n=18): FHZ ip (60mg/Kg/300mL;días:0,2) postcirugía simulada; 3) **GRUPO ESPLENECTOMIZADO NO ANÉMICO (GENA)** (n=18): SF ip postesplenectomía

(300mL;días:0,2); 4) **GRUPO ESPLENECTOMIZADO ANÉMICO (GEA)**(n=18): FHZ ip (60mg/Kg/300mL;días:0,2) postesplenectomía. **Sangre venosa:** cada 2 días hasta el día 10 (n=3). **Parámetros evaluados:** Hb, HCT, reticulocitos y cuerpos de Heinz. La esplenectomía se realizó bajo anestesia. Los tejidos fueron fijados con Bouin y Formol 10% y procesados para Hematoxilina-Eosina. **Islotes eritropoyéticos (IE)** semicuantificados por un score preestablecido. **Resultados:** Los grupos anémicos, con y sin bazo, mostraron hemólisis franca el día 4. La recuperación de la anemia fue el día 6 en el GA y el día 10 en el GEA. **Reticulocitosis máxima:** día 8 en el GEA y día 6 en el GA. **Cuerpos de Heinz:** elevados hasta el día 6 en GA y hasta el día 8 en GEA. Se observaron abundantes IE en hígado y en menor grado en riñón. **Con-**

clusiones: La recuperación eritropoyética en ratones esplenectomizados fue asumida principalmente por el hígado. La restauración tardía evidenció que el bazo es el órgano que compensa con mayor eficiencia la crisis hemolítica en esta cepa de ratones.

Palabras claves: eritropoyesis, anemia, esplenectomía, hígado, riñón.

ABSTRACT

Introduction: The spleen of the adult mouse takes part in the recovery of erythron because its stroma provides a micro-environment that is adequate for progenitor proliferation and maturing. **Objective:** To assess, by means of morphological studies, the degree of hepatic and renal erythropoiesis in splenectomized mice in response to phenylhydrazine (PHZ)-induced hemolysis. **Materials and Methods:** Female mice CF1(30±3g) were grouped into: 1) **CONTROL GROUP (CG)** (n=18): intraperitoneal (ip) physiological solution (PS) (300 µL; days: 0,2) post

Correspondencia:

Dra. Marta Roque. Laboratorio de Fisiología Humana, Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur. San Juan 670. (8000) Bahía Blanca. Argentina.
E-mail: mroque@uns.edu.ar

Recibido: 8 de noviembre de 2006

Aceptado: 18 de diciembre de 2006

simulated surgery; 2) *ANEMIC GROUP (AG)* (n=18): ip PHZ (60 mg / Kg / 300mL; days: 0, 2) post simulated surgery; 3) *SPLENECTOMIZED NON- ANEMIC GROUP (SNAG)* (n=18): ip PS post-splenectomy (300mL; days: 0, 2); 4) *SPLENECTOMIZED ANEMIC GROUP (SAG)* (n=18): ip PHZ (60 mg / Kg / 300 mL; days: 0, 2) post-splenectomy. Venous blood: every 2 days until day 10 (n=3). Parameters assessed: Hb, HCT, reticulocytes, and Heinz bodies. The splenectomy was performed under anesthesia. Tissues were fixed using Bouin and 10% Formalin and processed for Hematoxylin-Eosin. Erythropoietic Islands (EI) were semi-quantified by a pre-established score. Results: Anemic groups, with and without the spleen, showed marked hemolysis on day 4. Anemia recovery took place on day 6 in the AG and on day 10 in the SAG. Maximum Reticulocytosis: day 8 in the SAG and day 6 in the AG. Heinz Bodies were high until day 6 in AG and until day 8 in SAG. Abundant EI were observed in the liver and in a smaller degree in the kidney. Conclusions: Erythropoietic recovery in splenectomized mice was mainly assumed by the liver. Late restoration showed that the spleen is the organ that most efficiently compensates the hemolytic crisis in this mice strain.

Key words: erythropoiesis, anemia, splenectomy, liver, kidney.

INTRODUCCIÓN

El bazo es un órgano altamente vascularizado que presenta gran variabilidad estructural y funcional entre especies (1). En animales adultos sus fun-

ciones primarias incluyen hemopoyesis, con estímulo apropiado, eritrofagocitosis, reservorio de sangre e inmunomodulación (2,3).

La maduración del sistema hemopoyético murino consiste en una sucesión de procesos programados donde las células precursoras migran desde sitios embrionarios, como el saco vitelino, hasta el hígado fetal para finalmente anidar en la médula ósea (4,5). El bazo de ratón mantiene su función hemopoyética en la vida adulta aunque su rol está limitado principalmente a la eritropoyesis y a la megacariocitopoyesis (6-9). La eritropoyesis esplénica se manifiesta claramente frente a la disminución del aporte de oxígeno tisular o flebotomía, indicando que el estroma esplénico aporta un microentorno adecuado donde las células madres eritropoyéticas anidan, proliferan y maduran (9). Estudios previos han demostrado claramente la capacidad esplénica de sostener a largo plazo la reconstitución del tejido eritropoyético irradiado (6).

El rol eritropoyético del bazo de mamífero se manifiesta especialmente en situaciones de gran demanda como ocurre en la crisis hemolítica aguda inducida por drogas (10-12). Estudios clásicos de hematología experimental demostraron que la migración de células precursoras eritroides medulares hacia el bazo es el principal mecanismo que determina la eritropoyesis esplénica y le otorgan a este órgano un rol modulador sobre la actividad medular (13,14).

Los primeros estudios de inducción de anemia y reticulocitosis en animales de laboratorio se realizaron usando fenilhidra-

zina (FHZ) (15). La acción de este hemotóxico clásico está relacionada con el estrés oxidativo eritrocitario. La FHZ produce una acentuada oxidación de la oxihemoglobina a metahemoglobina con posterior desnaturalización de la proteína intraeritrocitaria y producción de cuerpos de Heinz lo que afecta la integridad de la membrana celular (11,15,16). En adición a sus efectos oxidantes sobre la hemoglobina, la FHZ genera un severo estrés oxidativo produciendo peroxidación lipídica, alteración de proteínas del citoesqueleto, depleción de sistemas enzimáticos y no enzimáticos, reducción de la deformabilidad de la membrana celular y activación del sistema inmune (17-19). La FHZ se une a la proteína banda 3 o «antígeno senescente» originando la unión de anticuerpos autólogos circulantes. El reconocimiento de este complejo Ag/Ac por macrófagos origina intensa fagocitosis esplénica y hepática (11,15,19).

La sumatoria de estos procesos conduce a lisis celular (15). Sin embargo, la lisis intravascular es un contribuyente menor en el mecanismo de hemólisis inducido por fenilhidrazina, siendo la hemólisis extravascular el mecanismo principal de remoción de eritrocitos dañados por esta droga hemolítica (17). Esto sugiere que ambos mecanismos de injuria hemolítica coexistirían en la anemia severa con diferente grado de contribución (17).

Se ha descrito que múltiples órganos contribuyen en forma coordinada a mantener el sistema hemopoyético en estados de gran demanda (4). El hígado recupera su función hemopoyéti-

ca en la etapa postnatal aunque no se ha aclarado totalmente su grado de participación en presencia y ausencia de bazo (4). No existen evidencias hasta el presente sobre la contribución eritropoyética renal en estados de intensa demanda en ausencia del bazo (20).

El propósito de este trabajo fue evaluar por estudios morfológicos y hematológicos el grado de compromiso eritropoyético hepático y renal en respuesta a la anemia aguda en ratones esplenectomizados.

MATERIALES Y METODOS

Animales

Se utilizaron ratones hembra CF1 (30 ± 3 g) provistos por el Bioterio de la Universidad Nacional del Sur. Los animales tuvieron acceso libre a agua y alimento, control diario del peso, respetando un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas, en una habitación con temperatura y humedad regulada. Los procedimientos estuvieron acordes con la «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals» (21).

Diseño experimental

Los animales fueron divididos en cuatro grupos: 1) *Grupo Control (GC)* (n=18) dosis intraperitoneales de solución fisiológica (SF) los días 0 y 2 del protocolo, luego de la cirugía simulada; 2) *Grupo Anémico (GA)* (n=18) dosis intraperitoneales de fenilhidrazina (Sigma Chemical Co, USA) 60 mg/kg de peso corporal en 0,5 mL de SF los días 0 y 2 del protocolo luego de la cirugía simulada; 3) *Grupo Esplenectomizado no Anémico (GENA)* (n=18) dosis intraperitoneales de SF los días 0 y 2 del protocolo luego de la esplenectomía; 4) *Grupo Es-*

plenectomizado Anémico (GEA) (n=18) dosis intraperitoneales de FHZ, 60 mg/kg de peso corporal en 0,5 mL de SF los días 0 y 2 del protocolo luego de la esplenectomía.

Preparación de Fenilhidrazina

La solución de fenilhidrazina fue preparada en buffer Fosfato de Potasio 0,1 M a pH 7,4. La solución estéril fue filtrada antes de su uso y fue administrada por vía intraperitoneal a una concentración de 60 mg/kg de peso corporal.

Procedimientos quirúrgicos

La extracción del bazo y la cirugía simulada se realizaron dentro de los 7 días previos a la inducción de anemia hemolítica. Los ratones fueron anestesiados con una solución de ketamina (*Ketafine* Brouwer) (3 mg/mL/0,7 mL) y xilacina en solución salina estéril (*Xylacina* Alfasan) (1 mg/mL). Luego de razer el cuadrante izquierdo del abdomen se realizó una pequeña incisión en la piel del flanco izquierdo y se procedió a abrir el peritoneo. Para la esplenectomía se cauterizaron los vasos esplénicos y se removió el bazo. Las incisiones se cerraron con hilo quirúrgico. A los lotes de cirugía simulada, se les abrió y cerró el peritoneo sin remover el bazo.

Estudios Hematológicos

Se obtuvieron muestras de sangre venosa del seno retroorbital, previa anestesia, utilizando capilares heparinizados. Las extracciones sanguíneas se realizaron cada dos días hasta el día 10 del protocolo experimental. La instauración y recuperación de la anemia se evaluaron por parámetros hematológicos convencionales: Hb, HCT, recuento

de reticulocitos, cuerpos de Heinz y Fórmula Leucocitaria. Los extendidos sanguíneos fueron coloreados con May Grünwald-Giemsa. El recuento de reticulocitos y de cuerpos de Heinz se realizó por coloración supravital (Azul Brillante de Cresilo) y los resultados se expresaron en porcentaje de células/1000 células.

Estudios Morfológicos

Los tejidos hepático y renal fueron removidos bajo condiciones estériles cada dos días hasta el día 10 del protocolo experimental. Los tejidos disecados se fijaron con Formol 10% y Bouin. Luego de procedimientos de rutina, los tejidos se embebieron en parafina y se obtuvieron cortes de 5 mm que se colorearon con Hematoxilina-Eosina. Los islotes celulares característicos de eritropoyesis activa fueron semicuantificados usando un score preestablecido que estima islotes eritropoyéticos (IE) en hígado cada 5 campos x 100 aumentos y cada 10 campos x 100 aumentos en riñón. Se establecieron dos scores para cada tejido: *Hígado*: a) 0-5: +; b) 6-15: ++; c) 16-50: +++; d) 51-100: ++++ y e) 101-150: +++++. *Riñón*: a) 0-5: +; b) 6-12: ++; c) 13-19: +++; d) >20: ++++.

Análisis Estadístico

Los resultados obtenidos se expresaron como la media aritmética \pm el error estándar de la media. Las diferencias estadísticas entre grupos tratados y el control se determinaron por el análisis de varianza de una vía (ANOVA), luego de realizar la prueba de Bartlett para establecer la homogeneidad de las varianzas. Cuando se detectaron diferencias significativas, se realizó el test de comparaciones múltiples de Dunnett. El nivel

de significancia se fijó en $p < 0,05$.

RESULTADOS

Estudios Hematológicos

Los valores de HCT y Hb del grupo anémico y del grupo esplenectomizado anémico disminuyeron progresivamente a partir del día 2 presentando hemólisis aguda el día 4 (HCT: $32,0\% \pm 0,71$; Hb: $8,8 \text{ g/dL} \pm 0,18$ y HCT: $30\% \pm 0,71$; Hb: $8,5 \text{ g/dL} \pm 0,03$, respectivamente); mientras que el Grupo Control y Grupo Esplenectomizado no Anémico no presentaron variaciones durante la experiencia (Figura 1). La recuperación de la anemia en

el Grupo Anémico con bazo se observó el día 6: HCT: $42,1\% \pm 1,41$; Hb: $11,81 \text{ g/dL} \pm 1,37$. En el Grupo Anémico sin Bazo, la recuperación ocurrió el día 10, donde se observaron valores de HCT de $46,9\% \pm 0,71$ y de Hb de $13,0 \text{ g/dL} \pm 0,23$.

El pico máximo de reticulocitos en el GEA se observó el día 8 ($57\% \pm 10$) y fue consistente con la respuesta eritropoyética tardía respecto al GA, ($58\% \pm 15$, día 6) (Figura 1).

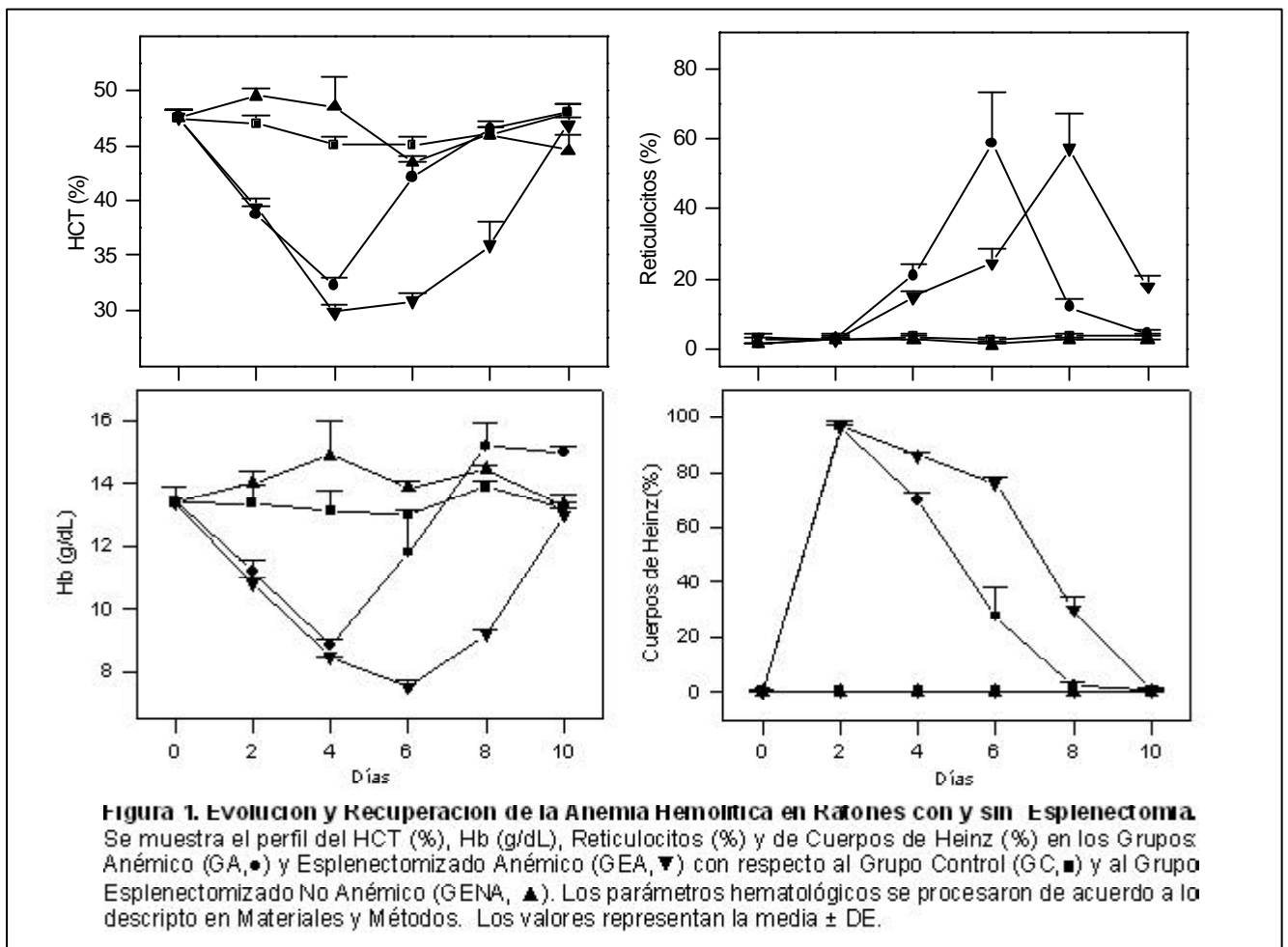
Tanto en el GA como en el GEA, a partir del día 2 aumentaron significativamente los cuerpos de Heinz, siendo $96\% \pm 1,41$ y $96,5\% \pm 2,12$, respectivamente

y continuaron elevados hasta el día 6 en el GA ($27,5\% \pm 10,6$) y hasta el día 8 en GEA ($30\% \pm 5$) (Figura 1).

En el Grupo Esplenectomizado Anémico fue evidente la celularidad atípica, con presencia de numerosos Cuerpos de Howell-Jolly, Sombras de Gumprecht, eritrocitos con punteado basófilo, anisocitosis y poiquilocitosis (Figura 2 A, B, C, D).

Estudios Histopatológicos

No se observaron variaciones significativas en el peso de los órganos estudiados a lo largo de la experiencia: a) Hígado GC: $5,2\% \pm 0,10$ peso del órgano/peso del animal; b) Hígado GA:



5,7% ± 0,35; c) Hígado GEA: 5,9% ± 0,23; d) Riñón GC: 0,64% ± 0,06; e) Riñón GA: 0,69% ± 0,09; f) Riñón GEA: 0,71% ± 0,04).

En la Tabla 1 se muestra la semicuantificación de islotes celulares con morfología eritropoyética en hígado y riñón de los grupos estudiados. Los resultados obtenidos muestran una acentuada actividad eritropoyética hepática en el GEA a partir del día 6 y hasta el día 10, observándose el mayor número de islotes con morfología eritropoyética el día 8, consistente con la recuperación de la anemia. En el grupo anémico con bazo, se observó un aumento en la actividad eritropoyética hepática el día 6 aunque de menor grado respecto al GEA. La localización hepática de islotes con morfología eritropoyética fue sinusoidal, siendo mínima la contribución en el entorno de vasos sanguíneos (Figura 3, A y B).

La examinación histológica renal no mostró gran compromiso eritropoyético de este tejido en la recuperación de la anemia aguda, siendo similar lo hallado en el GEA y en el GA, respecto a GC y GENA (Figura 4, A y B).

DISCUSIÓN

La habilidad del bazo para remover de circulación eritrocitos alterados es ampliamente aceptada (22). En estados de hemólisis severa como en la anemia inducida por fenilhidrazina, el bazo actúa depurando células sanguíneas sensibilizadas por los efectos oxidantes de la droga (15,16). La remoción de los cuerpos de Heinz que protuyen de la membrana de los eritrocitos se lleva a cabo por «picoteo esplé-

co» (22).

En nuestro modelo de ratón anémico esplenectomizado, la ausencia de la función eritrofagocítica del bazo, se evidencia por el incremento sostenido de celularidad atípica en sangre periférica con la presencia cuerpos de Howell Jolly que permanecen más días en circulación. Algunos autores atribuyen la presencia de cuerpos de Howell Jolly a la ausencia de «picoteo esplénico» (22). Como consecuencia, se produciría la transformación de los cuerpos de Heinz en estas estructuras esféricas sobre la membrana del eritrocito (22).

El punteado basófilo (ARN residual) podría estar indicando citotoxicidad ó alteraciones en la maduración eritrocítica aunque la reticulocitosis es un índice claro de eritropoyesis regenera-

tiva (23).

La presencia de estas anomalías nucleares y citoplasmáticas en los eritrocitos, podría estar indicando una posible toxicidad medular de la FHZ, aunque existen controversias respecto a los efectos citotóxicos de la droga (24). Resulta razonable asociar la presencia y persistencia de estas anomalías en sangre periférica con la ausencia de la función hemocaterética esplénica.

Nuestros resultados mostraron que la liberación de reticulocitos a circulación en ratones esplenectomizados fue tardía respecto al grupo de ratones con bazo, lo que confirmó el desplazamiento temporal en la recuperación del eritrón del grupo anémico esplenectomizado.

En el modelo no esplenectomizado la anemia fue compen-

	Días	Control (GC) +	Anémico (GA) -	Esplenectomizado anémico (GEA) -	Esplenectomizado No anémico (GENA) -
Hígado	0				
	4	+	+	++	+
	6	+	+++	++++	+
	8	+	+	+++++	+
	10	+	+	+++	+
Riñón	0	+	-	-	-
	4	+	++	+	+
	6	+	++	+	+
	8	+	++	++	++
	10	+	+	+	+

Tabla 1. Semicuantificación de Islotes Celulares con Morfología Eritropoyética en Hígado y Riñón en la Anemia Hemolítica postesplenectomía. Escore Hígado: a) 0-5: +; b) 6-15: ++; c) 16-50: +++; d) 51-100: ++++ y e) 101-150: +++++. **Escore Riñón:** a) 0-5: +; b) 6-12: ++; c) 13-19: +++; d) >20: +++++. Los tejidos se procesaron para H&E según lo descrito en Materiales y Métodos.

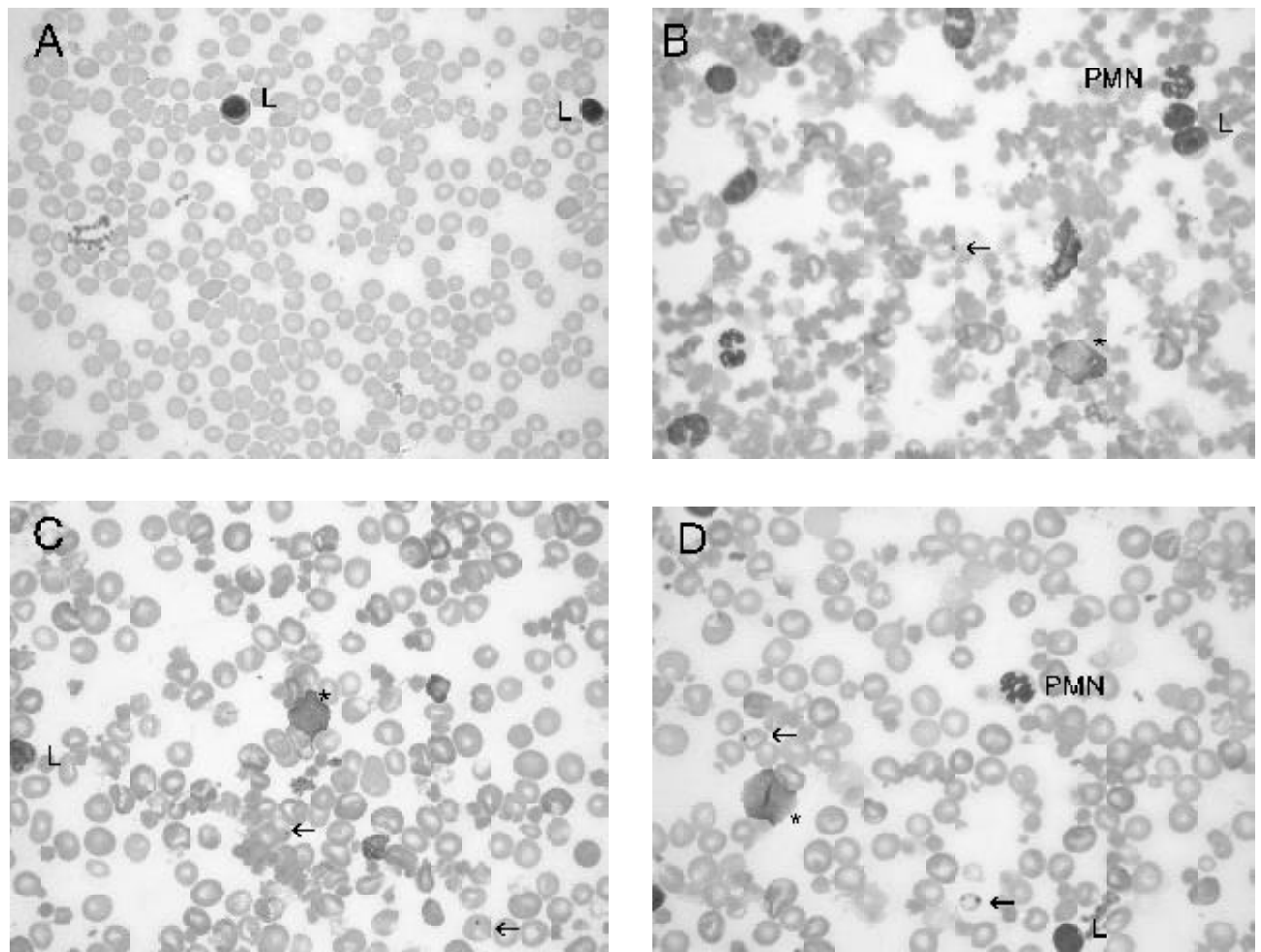


Figura 2. Cambios en la Celularidad Sanguínea en la Anemia Postesplenectomía. **A)** Grupo Control (GC): normocromía y normocitosis ; **B)** Grupo Esplenectomizado Anémico (GEA), día 4: Cuerpos de Howell-Jolly (←), Sombras de Gumprecht (SG), anisocitosis y poiquilocitosis; **C)** Grupo Esplenectomizado Anémico (GEA), día 6: destrucción celular, Cuerpos de Howell-Jolly (←), Sombras de Gumprecht (SG), anisocitosis y poiquilocitosis; **D)** Grupo Esplenectomizado Anémico (GEA), día 8: Cuerpos de Howell-Jolly (←) y Sombras de Gumprecht (SG). PMN: polimorfonuclear; L: linfocito.

sada principalmente por la actividad hemopoyética esplénica, mientras que en el modelo de anemia con esplenectomía la restauración de la actividad eritropoyética fue principalmente hepática.

Los estudios morfológicos mostraron eritropoyesis hepática en animales esplenectomizados tratados con FHZ evaluada por abundantes agrupaciones celulares con morfología eritroi-

de en este tejido, siendo mínima la contribución del tejido renal.

Los islotes celulares organizados en unidades anatómicas denominadas islotes eritroblásticos representan agrupaciones de células eritroides en diferentes estadios de maduración organizados alrededor de un macrófago (25). La presencia de estas agrupaciones en hígado, confirma la participación de este tejido en la restauración de la

anemia hemolítica.

Hasta el presente, no ha sido informada en la literatura la presencia de islotes eritropoyéticos en el riñón observada en nuestro modelo experimental. Actualmente estamos desarrollando estudios orientados a confirmar la participación del tejido renal en la restauración del eritrón en ratones anémicos esplenectomizados.

Estudios previos mostraron

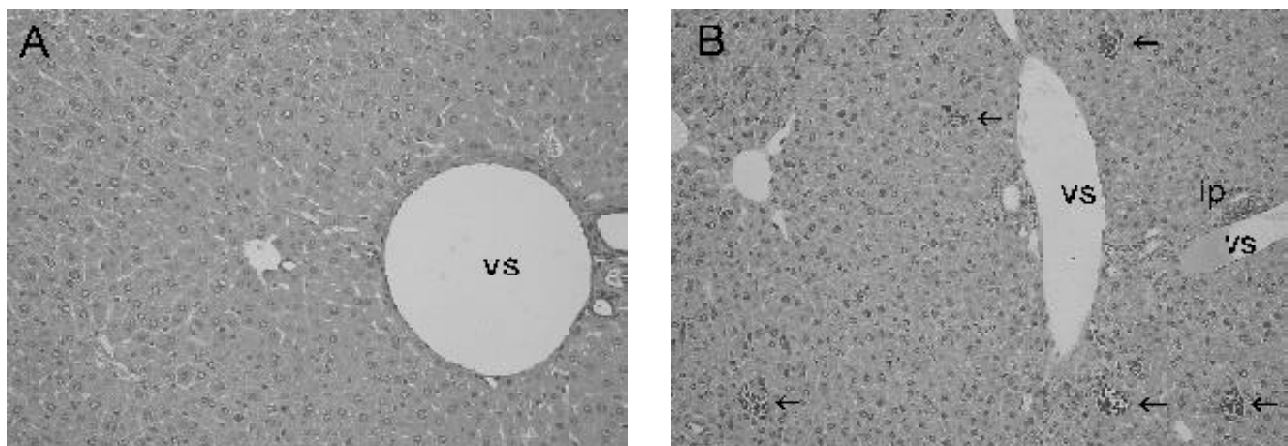


Figura 3. Islotes Celulares con Morfología Eritropoyética en Hígado en la Anemia Hemolítica postesplenectomía. A) Hígado Control (GENA); B) Hígado GEA, día 6: se observan abundantes islotes sinusoidales (is) e islotes perivascuales (ip). VS: vaso sanguíneo. Los tejidos se procesaron para H&E según lo descrito en Materiales y Métodos (x 2000).

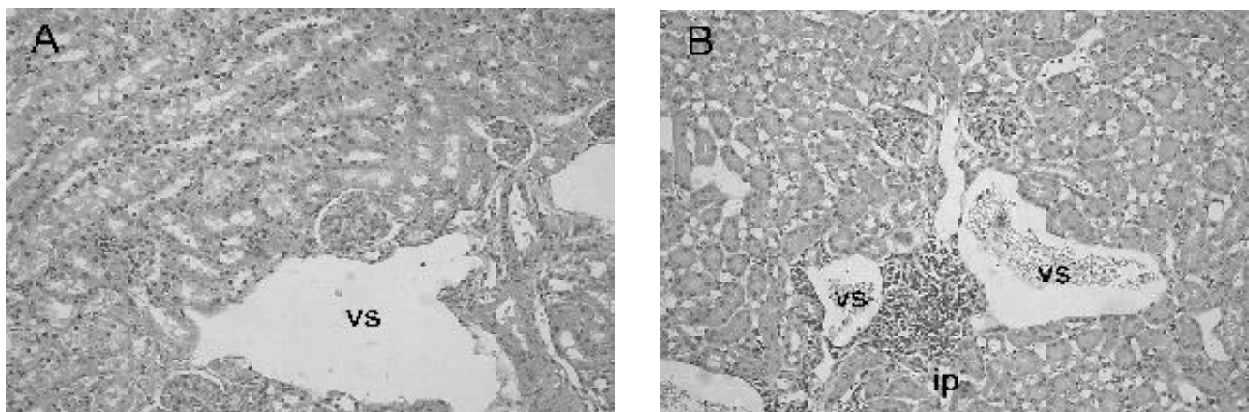


Figura 4. Islotes Celulares con Morfología Eritropoyética en Riñón en la Anemia Hemolítica postesplenectomía. A) Riñón Control (GENA); B) Riñón GEA, día 8: se observan escasos islotes perivascuales (ip). VS: vaso sanguíneo. Los tejidos se procesaron para H&E según lo descrito en Materiales y Métodos (x 2000).

la participación del hígado en la restauración del eritrón en la anemia inducida por fenilhidrazina mediante estudios de captación de hierro y por la presencia de precursores eritropoyéticos en este tejido extramedular (26,27). Ha sido ampliamente descrito que tanto la eritropoyesis esplénica como hepática dependen de la migración de células precursoras hemopoyé-

ticas desde la médula ósea hacia tejidos extramedulares donde anidan, proliferan y maduran (28, 29).

Un aporte novedoso de nuestro estudio fue asociar la presencia de islotes celulares sinusoidales con la recuperación eritropoyética tardía evaluada por parámetros hematológicos y morfológicos. En efecto, la respuesta eritropoyética hepática

observada en los ratones esplenectomizados compensó la anemia hemolítica en una etapa posterior a la observada en ratones con bazo.

Finalmente, podemos concluir que la ausencia del bazo no afectó la recuperación del estado de anemia, sólo se modificó el rango temporal de restauración del eritrón. Nuestros resultados muestran que en ausencia de

bazo la función eritropoyética es asumida principalmente por un órgano extramedular como el hígado. Sin embargo, el tejido hepático no responde tan eficientemente al estrés hematológico como el tejido esplénico.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado con el apoyo de la Secretaria General de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional del Sur (PGI-24/B116) y de la Agencia Nacional para la Promoción Científica y Tecnológica (FONCYT). Tania Veuthey y Cecilia D'Anna son Becarias del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

BIBLIOGRAFÍA

- Bowdler AJ. The spleen: structure, function and clinical significance. Edited by Bowdler AJ, Chapman and Hall Medical, London, 1990.
- Christopher MM. Cytology of the spleen. *Vet Clin Small Anim* 2003; 33:135-52.
- Van Krieken JHJM, Te Velde J. Spleen. In: *Histology for Pathologists*. Second edition. Edited by Sternberg SS. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1997, pp. 675-685.
- Wolber FM, Leonard E, Michael S, Orschell-Traycoff CM, Yoder MC, Srour EF. Roles of spleen and liver in development of the murine hematopoietic system. *Exp Hematol* 2002; 30: 1010-9.
- Keller G, Lacaud G, Robertson S. Development of the hematopoietic system in the mouse. *Exp Hematol* 1999; 27: 777-87.
- Dor F, Ramirez ML, Parmar K et al. Primitive hematopoietic cell populations reside in the spleen: studies in the pig, baboon and human. *Exp Hematol* 2006; 34:1573-82.
- Slayton WB, Georgelas A, Pierce LJ, et al. The spleen is a major site of megakaryopoiesis following transplantation of murine hematopoietic stem cells. *Blood* 2002; 100:3975-82.
- Ohno H, Ogawa M, Nishikawa S, Hayashi S, Kunisada T, Nishikawa S. Conditions required for myelopoiesis in murine spleen. *Immunol Lett* 1993; 35: 197-204.
- Yanai N, Satoh T, Obinata M. Endothelial cells create a hematopoietic inductive micro-environment preferential to erythropoiesis in the mouse spleen. *Cell Struct and Funct* 1991; 16: 87-93.
- Sadahira Y, Yasuda T, Yoshino T, et al. Impaired splenic erythropoiesis in phlebotomized mice injected with CL2MDP-liposome: an experimental model for studying the role of stromal macrophages in erythropoiesis. *J Leukoc Biol* 2000; 68: 464-70.
- Latunde-Dada GO, McKie AT, Simpson RJ. Animal models with enhanced erythropoiesis and iron absorption. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1762:414-23.
- Redondo PA, Alvarez AI, Diez C, Fernandez-Rojo F, Prieto JG. Physiological response to experimentally induced anemia in rats: a comparative study. *Lab Anim Sci* 1995; 45: 578-83.
- Rencricca NJ, Rizzoli V, Howard D, Duffy P, Stohlman F. Stem cell migration and proliferation during severe anemia. *Blood* 1970;36: 764-71.
- Kozlov VA, Zhuravkin IN, Coleman RM, Rencricca NJ. Splenic plaque-forming cells (PFC) and stem cells (CFU-s) during acute phenylhydrazine-induced enhanced erythropoiesis. *J Exp Zool* 1980; 213:199-203.
- Magnani M, Stocchi V, Cucchiarini L, Chirantini L, Fornaini G. Red blood cell phagocytosis and lysis following oxidative damage by phenylhydrazine. *Cell Biochem Funct* 1986; 4:263-9.
- Dornfest BS, Lapin DM, Naughton BA, Adu S, Korn L, Gordon AS. Phenylhydrazine-induced leukocytosis in the rat. *J Leukoc Biol* 1986; 39:37-48.
- McMillan DC, Jensen CB, Jollow DJ. Role of lipid peroxidation in dapsone-induced hemolytic anemia. *J Pharmacol Exp Ther* 1998;287: 868-76.
- Bates DA, Winterbourn CC. Haemoglobin denaturation, lipid peroxidation and haemolysis in Phenylhydrazine-induced anaemia. *Biochim Biophys Acta* 1984; 798: 84-7.
- Naughton BA, Dornfest BS, Bush ME, Carlson CA, Lapin DM. Immune activation is associated with Phenylhydrazine-induced anemia in the rat. *J Lab Clin Med* 1990; 116: 498-507.
- Sequeira Lopez ML, Chernavsky DR, Nomasa T, Wall L, Yanagisawa M, Gomez RA. The embryo makes red blood cell progenitors in every tissue simultaneously with blood vessel morphogenesis. *Am L Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003; 284: 1126-37.
- Committee on Care and Use of Laboratory Animals. (1996) *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (Natl. Inst. Health, Bethesda), NIH Publ. No. 86-23 (DRR/NIH)
- Rothberg H, Corallo LA, Crosby WH. Observations on heinz bodies in normal and splenectomized rabbits. *Blood Journal* 1959; 14: 1180-6.
- Valentine WN, Paglia DE, Fink K, Madokoro G. Lead Poisoning: association with hemolytic anemia, basophilic stippling, erythrocyte pyrimidine 5'-nucleotidase deficiency, and intraerythrocytic accumulation of pyrimidines. *J Clin Invest* 1976; 58:926-32.

24. Yamaguchi F, Furuhashi K, Miyamoto M, Sagara Ishijima NI, Takayama S. Application of hematopoietic progenitor assays for the estimation of hematotoxicity in rats. *J Pharmacol Toxicol Methods* 1994; 31: 71-7.
25. Yokoyama T, Etoh T, Kitagawa H, Tsukahara S, Kannan Y. Migration of erythroblastic islands toward the sinusoid as erythroid maturation proceeds in rat bone marrow. *J Med Sci* 2003; 65(4): 449-52.
26. Molineux G, Pojda Z, Dexter TM. A comparison of hematopoiesis in normal and splenectomized mice treated with granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 1990; 75: 563-69.
27. Ploemacher RE, van Soest PL, Vos O. Kinetics of erythropoiesis in the liver induced in adult mice by phenylhydrazine. *Scand J Haematol* 1977; 19: 424-34.
28. Hara H, Ogawa M. Erythropoietic precursors in mice with phenylhydrazine-induced anemia. *Am J Hematol.* 1976; 1:453-8.
29. Hara H, Ogawa M. Erythropoietic precursors in mice under erythropoietic stimulation and suppression. *Exp Hematol.* 1977; 5:141-8.