

24-191



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**“CAMBIOS EN LOS PARAMETROS HEMATOLÓGICOS Y ASPECTOS  
DEL TRANSPORTE DEL HIERRO DURANTE LAS PRIMERAS  
ETAPAS DEL DESARROLLO POSTNATAL EN EL CONEJO.”**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE**

**B I O L O G O**

**QUE PRESENTA:**

**NORA CECILIA VAZQUEZ LASLOP**

**MEXICO, D. F.**

**1 9 8 4**



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 está 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.

## INDICE

Introducción .....	1
Materiales y Métodos .....	11
- Procesamiento de la sangre .....	11
- Hematocrito .....	11
- Concentración de hemoglobina.....	11
- Conteo de células .....	12
- Tinción para reticulocitos .....	12
- Cuantificación de hierro .....	13
- Obtención de anticuerpos antitransferrina.....	16
- Determinación de la concentración de transferrina en el plasma...	17
- Determinación de la actividad de ceruloplasmina.....	19
Resultados.....	22
- Crecimiento de los conejos.....	22
- Evaluación de los parámetros hematológicos.....	22
• Hematocrito .....	25
• Concentración de hemoglobina .....	25
• Número de células rojas .....	25
• Porcentaje y número de reticulocitos .....	25
• Diámetro de las células rojas circulantes .....	30
• VMC, HMC, CMHC.....	30
- Evaluación de los parámetros cuantificados en el plasma.....	33
• Concentración de hierro no hémico en plasma.....	36
• Concentración de hierro en hemolizados de paquete celular sanguíneo.....	36
• Concentración de transferrina.....	38
• Saturación de la transferrina.....	38
• Actividad de la ceruloplasmina.....	43
- Correlaciones entre diferentes parámetros.....	43
Discusión.....	45
Conclusiones.....	52
Referencias.....	53

Abreviaturas :

Ag -	antígeno
BFU-E	Unidad expansiva de colonias eritroides
CFU-E	Unidad formadora de colonias eritroides
CFU-L-M	Unidad formadora de colonias linfoides y mieloides
CMHC	Concentración media de hemoglobina corpuscular
Cp	Ceruloplasmina, actividad de ceruloplasmina
Cu	Cobre
DNA	Acido desoxirribonucléico
DPD	N,N-dimetilparafenilendiamonio dicloruro
2,3-DPG	2,3-difosfoglicerato
EDTA	Acido etilendiamino tetra-acético
Fe	Hierro, concentración de hierro
Hb	Hemoglobina, concentración de hemoglobina
HMC	Hemoglobina media corpuscular
Ht	Porcentaje de hematocrito.
NCR	Número de células rojas
P	probabilidad
PBS	amortiguador salino de fosfatos
r	coeficiente de correlación lineal
t	tiempo
T	Temperatura
TCA	ácido tricloroacético

Tf	Transferrina, concentración de Transferrina
VMC	Volumen medio corpuscular
$\bar{X}$	Valor promedio
$\emptyset$	Diámetro

## INTRODUCCION

Los cuatro átomos de hierro que contiene cada molécula de hemoglobina son los que le confieren su capacidad para transportar el oxígeno, vital para todas las células de metabolismo aeróbico. Por ello, los mecanismos para obtener, transportar y almacenar el hierro y el proceso de síntesis de hemoglobina son dos hechos que deben estar coordinados dentro de un organismo.

El proceso de formación de las células rojas sanguíneas es conocido como eritropoyesis. Las células precursoras de los eritrocitos constituyen el lugar donde se lleva a cabo la síntesis de la hemoglobina y por esto, la eritropoyesis debe responder a las necesidades de hemoglobina del organismo en un momento determinado. Durante el desarrollo normal de un organismo tales requerimientos van teniendo condiciones especiales. Es decir, la eritropoyesis en las etapas embrionaria, fetal y adulta, posee características distintivas.

No obstante, durante el desarrollo de los mamíferos, la eritropoyesis presenta ciertas características en común (1):

1. La existencia de dos poblaciones diferentes de células eritroides: las células llamadas primitivas, exclusivas de la etapa embrionaria, y las células llamadas definitivas, que se presentan en la etapa fetal y en la adulta.
2. El cambio de sitio de eritropoyesis de la línea celular definitiva. Las primeras de estas células, las de la etapa fetal, se forman en las células hepáticas y posteriormente el sitio de eritropoyesis, propio del adulto, es la médula ósea.
3. El tipo de hemoglobina que contienen las células primitivas es diferente del que contienen las definitivas.

Las células rojas de la línea primitiva tienen su origen en el saco vitelino (2). En comparación con las poblaciones celulares posteriores, estas células son de gran tamaño y retienen su núcleo, aunque

estén completamente diferenciadas y ya en circulación (2, 3). Además poseen hemoglobina de tipo embrionario.

Otra característica especial de las células rojas circulantes - de las etapas embrionarias, es que contienen ferritina, proteína almacenadora de hierro. Este hecho llevó a pensar que tales células no sólo tenían un papel en el transporte de oxígeno, sino que podrían estar involucradas de alguna manera en el metabolismo de hierro durante las primeras etapas del desarrollo, etapas en las cuales la actividad eritropoyética y la síntesis de hemoglobina deben ser especialmente elevadas. El hierro almacenado en las células rojas circulantes de la línea primitiva no sólo se ha encontrado en los mamíferos, como el ratón y el hombre, sino también en larvas de anfibios y en embriones de pollo. Este hierro es utilizado por la primera generación de las células rojas definitivas de la etapa fetal, a pesar - de que el hígado ya contiene reservas de hierro. Este órgano será el principal sitio de almacenamiento de hierro durante la fase adulta - (7-12).

Las células rojas de la línea definitiva se originan en dos sitios diferentes. El primero de ellos es el hígado, que produce células todavía de gran tamaño pero carentes de núcleo cuando están ya en circulación. El segundo sitio, que será el principal durante toda la etapa adulta, es la médula ósea. El tamaño promedio de los eritrocitos va disminuyendo gradualmente, hasta que, a los pocos días - después del nacimiento son completamente sustituidos por los eritrocitos pequeños formados en la médula ósea (1, 3).

El suplemento de oxígeno para el feto de un mamífero depende directamente de la comunicación entre la sangre materna y la sangre fetal a través de la placenta y su transferencia está en relación directa con la afinidad por el  $O_2$  que tenga la hemoglobina fetal con respecto a la del adulto. En algunos casos, tal afinidad está modulada por un metabolito intermediario de la glucólisis, el 2, 3-difosfoglicerato ó 2, 3-DPG. El efecto del 2, 3-DPG sobre la molécula de hemoglobina es que disminuye la afinidad de ésta por el oxígeno. Este metabolito se une débilmente a la molécula de hemoglobina de tipo fetal que a la de tipo adulto y, por lo tanto, la hemoglobina del feto

puede tomar fácilmente el oxígeno de la sangre materna (5).

Cuando las células rojas que contienen la hemoglobina fetal son reemplazadas por los eritrocitos con hemoglobina adulta, la sangre adquiere las características fisiológicas del organismo adulto en cuanto a su manera de ligar el oxígeno. Algunas especies no poseen hemoglobina de tipo fetal, y, sin embargo, ocurre este mismo tipo de cambios fisiológicos. En estos casos, la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno se explica con base en las variaciones de los niveles de 2, 3-DPG con respecto a los de hemoglobina. En los cobayos y en los conejos, por ejemplo, los niveles de 2, 3-DPG se mantienen bajos durante la etapa fetal y sólo se incrementan después del nacimiento, permaneciendo elevados durante la etapa adulta (6).

Particularmente en el conejo, la proporción de 2, 3-DPG con respecto a la hemoglobina encontrada en la etapa fetal es de alrededor de 3  $\mu\text{moles}$  de DPG/g de hemoglobina. Los niveles característicos del adulto, 25  $\mu\text{moles}$  de DPG/g de hemoglobina, son alcanzados a los 20 días de edad, aproximadamente (6). Datos obtenidos en este laboratorio concuerdan con este aumento en los niveles de 2, 3-DPG. Además, indican que en el conejo existe un recambio de células rojas circulantes grandes, de alrededor de 90  $\mu\text{m}^3$  de volumen, correspondientes a la etapa fetal, por células de menor tamaño, de unas 60-70  $\mu\text{m}^3$ , que serán las definitivas para el adulto. El período del recambio de poblaciones, los primeros 20 días de edad, coincide con el período en el que los niveles de 2, 3-DPG alcanzan los valores del adulto. Es por esto que la proporción baja de 2, 3-DPG con respecto a la hemoglobina se ha relacionado con la población de células grandes fetales que aún existen en las primeras etapas después del nacimiento -- (40).

Las diferencias entre la sangre fetal y la adulta en las etapas inmediatas al nacimiento, especialmente en el caso del conejo (que será tratado en este trabajo), pueden resumirse en dos puntos:

1. El tamaño de las células rojas circulantes del feto es mayor que el de las células adultas.
2. La proporción de 2, 3-DPG/hemoglobina en los eritrocitos fetales es menor que en los adultos.

El recambio de poblaciones celulares y la síntesis de hemoglobina para las células nuevas son dos hechos que deben estar coordinados. Por ello, es de esperarse que los factores involucrados en la movilización del hierro, ya sea que éste provenga del interior de los eritrocitos, del hígado, o de alguna otra reserva, tengan características especiales en las primeras etapas postnatales con respecto a las etapas adultas.

Los factores involucrados en la movilización del hierro son básicamente la transferrina, la ferritina y la ceruloplasmina, de las cuales trataré a continuación. El objetivo del presente trabajo es estudiar algunos aspectos del sistema de movilización del hierro en las primeras etapas postnatales del conejo, con base en el recambio de poblaciones de células rojas circulantes.

#### El hierro y los seres vivos.

El hierro es uno de los elementos esenciales para los seres vivos. Quizá su mayor importancia radica en su presencia dentro de la molécula de hemoglobina. De su suplemento en cantidades adecuadas depende la maduración de las células rojas sanguíneas y el contenido de hemoglobina en cada una de ellas.

Pero además de la relación del hierro con la eritropoyesis, las funciones que desempeña este ión metálico son muy variadas a lo largo de toda la escala de seres vivos. El hierro desempeña funciones importantes en los siguientes procesos:

- El flujo de electrones a través de la cadena respiratoria. El hierro se encuentra tanto en los citocromos como en las proteínas sulfopépticas que componen a estas vías bioenergéticas (13).
- La activación de oxígeno molecular, nitrógeno e hidrógeno (14).
- La descomposición de derivados tóxicos de oxígeno, tales como peróxido y superóxido (14).
- La síntesis de DNA (14).
- La unión del oxígeno a la hemoglobina, la mioglobina y las hemeritrinas. Además la ferroquelatasa es la enzima mitocondrial que participa en la inserción del hierro en las porfirinas (13).

- La síntesis de la colágena en el tejido conectivo, ya que este metal se requiere para la hidroxilación de la prolina y de la lisina en la procolágena (15).

Por todo esto, la obtención del hierro del medio constituye un paso crucial para prácticamente todos los organismos.

En la corteza terrestre el hierro que puede estar disponible para los seres vivos se encuentra, en su mayor parte, en forma de sales férricas. El hierro en su estado ferroso, Fe (II), es a cualquier pH, más soluble que en su estado férrico, Fe (III), lo cual trae como consecuencia que el Fe (II) sea más fácilmente absorbido por un organismo (14, 16). Sin embargo, sólo los organismos anaerobios estrictos pueden satisfacer sus necesidades de hierro absorbiendo el Fe (II) soluble que se encuentre en su medio de crecimiento. Los microorganismos aeróbicos y los anaeróbicos facultativos sintetizan compuestos altamente afines por el Fe (III) que se conocen como sideróforos, y cuya función es introducir el hierro. Este transporte es mediado por receptores (17).

La aparición del oxígeno molecular en la atmósfera primitiva pudo traer como consecuencia la oxidación de Fe (II) a Fe (III), el cual se precipita como hidróxido férrico. Desde este punto de vista, los sideróforos constituyen la solución a la captación y absorción de Fe (III) por parte de los microorganismos (17).

Los animales son incapaces de sintetizar sideróforos. El primer paso en el proceso de absorción del hierro es, en este caso, la reducción del Fe (III) a Fe (II) para que posteriormente pueda ser transportado a través de la membrana intestinal (18).

La digestión péptica libera aproximadamente un 50% del hierro contenido en el alimento, gran parte como hierro inorgánico, que a nivel del intestino forma distintos complejos disponibles para la absorción. Es a nivel de las células epiteliales del intestino donde actúan de manera más importante los mecanismos que controlan la absorción de este elemento (19).

Existen primordialmente dos proteínas que tienen un papel central en el metabolismo del hierro. Una de ellas es la ferritina que constituye el principal almacén de hierro en el organismo. Si la -

cantidad de hierro almacenado es suficientemente grande, se estimula la síntesis de ferritina y parte del hierro absorbido se incorpora a ella. Si los niveles de hierro disponible dentro de la célula del epitelio intestinal son bajos, se incrementa la captación de hierro de la luz intestinal y, por otro lado, aumenta la transferencia del hierro almacenado hacia el plasma sanguíneo, donde se unirá a la transferrina, la proteína especializada en el transporte de hierro dentro del organismo (19).

### Eritropoyesis y Transferrina.

La presencia de la transferrina en el plasma garantiza que el hierro absorbido permanezca unido a proteína, evitando así la formación de hidróxido férrico insoluble, aunque su principal función es que hace al hierro disponible para el tejido eritropoyético (20).

Las células sanguíneas son el resultado de un proceso de maduración bien sincronizado que se da, de acuerdo con la hipótesis más aceptada, a partir de una célula pluripotente (21, 22). La CFU-L-M (unidad formadora de colonias linfoides y mieloides) es capaz de dar lugar a linfocitos, plaquetas, granulocitos, monocitos y eritrocitos, todos ellos células circulantes. Me ocuparé, muy brevemente, sólo de la línea roja.

El agente humoral que induce la diferenciación de las células pluripotentes en células comprometidas hacia la línea roja, es una glicoproteína producida principalmente en el riñón, la eritropoyetina. Bajo condiciones normales se sintetiza en respuesta a la hipoxia tisular, aumentando de esta manera la producción de eritrocitos (21).

Las primeras células comprometidas en la línea son las BFU-E (unidad expansiva de colonias eritroides) que, como consecuencia de la acción de la eritropoyetina, dan lugar al siguiente estado de maduración, las CFU-E (unidad formadora de colonias eritroides), células que originarán a las primeras células eritroides propiamente dichas, los pronormoblastos. Después de varias divisiones mitóticas,

los pronormoblastos originan a los reticulocitos, cuyas principales transformaciones son la acidificación y la condensación del núcleo (22, 23).

El primero de estos cambios se debe a que la principal actividad de las células eritroides es la síntesis de hemoglobina y la conclusión del segundo cambio es la expulsión del núcleo, dando entonces lugar a los eritrocitos, de menor tamaño que los reticulocitos, pero que al no tener núcleo poseen espacio para contener una mayor cantidad de hemoglobina (24).

Una característica importante de las células rojas inmaduras es que poseen en la superficie de su membrana plasmática receptores específicos para la transferrina. El número de estos receptores va disminuyendo a medida que las células maduran, es decir, cuando baja la síntesis de hemoglobina y por lo tanto, sus requerimientos de hierro son menores (25).

La transferrina está constituida por una sola cadena polipeptídica, cuya estructura tridimensional da lugar a dos sitios específicos capaces de unir, cada uno, un átomo de hierro. Su peso molecular es de alrededor de 80 000; es una glicoproteína ya que posee un 6% de residuos de carbohidratos en su composición (26,27). Se ha propuesto que las moléculas de carbohidratos son los puntos de reconocimiento entre la proteína y sus receptores específicos en la superficie de la membrana de las células rojas inmaduras de la médula ósea (27).

Algunas evidencias experimentales apoyan el hecho de que la saturación de la transferrina que llega a la médula ósea puede ser un factor regulador de la donación del hierro a los reticulocitos. Los reticulocitos tienen una mayor afinidad por la transferrina unida al hierro que por la que no lo está (28). Por otra parte, Fletcher y Huehns (29) han sugerido que la manera como esté unido el hierro a la transferrina determinará el intercambio del hierro entre el plasma y las células intestinales. El hierro será removido con mayor facilidad de las moléculas de transferrina con dos átomos de hierro, cuyo número dependerá de la actividad eritropoyética y de la cantidad de hierro almacenado (29, 30).

## Ferritina

Una característica de la ferritina es que el hierro que contiene es una reserva movilizable regulada a nivel de síntesis de la apoferritina y del depósito y liberación del hierro.

La ferritina es una proteína que se encuentra en el interior de las células de hígado, de bazo y de médula ósea y, en casos especiales, en células sanguíneas circulantes (14). Su forma es prácticamente esférica, con una cavidad central que contiene al hierro en forma de complejos de óxido férrico hidratado, arreglados como celdas hexagonales. Cada molécula de ferritina puede contener de 2500 hasta 4000 ó 5000 átomos de hierro; éstos se introducen a la cavidad central mediante canales que atraviesan la molécula protéica (31).

La ferritina tiene un peso molecular de aproximadamente 450000 y, de acuerdo con el modelo más aceptado, está constituida por 24 subunidades, cada una con un peso molecular de 19000 (31).

Las moléculas de ferritina que tienen sus cavidades centrales parcialmente llenas, pueden tomar hierro más fácilmente que la apoferritina, lo cual parece estar relacionado con la superficie de captación que van formando los complejos de hierro acumulado (32).

Aparentemente la cantidad y estado de la ferritina que se encuentra en la pared intestinal, juega un papel en la absorción del hierro. Se ha propuesto que la ferritina puede inhibir la absorción de este ión metálico, protegiendo al organismo de la entrada de cantidades tóxicas del mismo en la sangre. Por otro lado, las vías de eliminación de hierro en el organismo son muy limitadas, por lo cual la ferritina no sólo almacena el hierro absorbido en la dieta, sino también el que es liberado de la hemoglobina (33).

## Ceruloplasmina y Metabolismo del Hierro.

Los eritrocitos viejos son removidos de la circulación al ser fagocitados por las células del retículo endotelial del bazo, del hígado y de la médula ósea (34). La hemoglobina contenida en los --

eritrocitos es catabolizada, proceso que tiene como resultado la liberación del hierro del hemo. Este hierro puede encontrarse oxidado o reducido, dependiendo de si proviene de la hemoglobina o de la metahemoglobina. Al parecer, al ser liberado enzimáticamente queda todo en estado ferroso. Por otra parte, el hierro absorbido durante la digestión se encuentra en su mayor parte, como ya se mencionó, como Fe (II), por ser la forma más soluble. Sin embargo, el hierro que se incorpora a la transferrina debe encontrarse en su forma oxidada, es decir, como Fe (III).

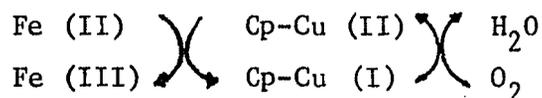
Existe en el plasma una enzima, del grupo de las alfa globulinas, que tiene la capacidad de acelerar la oxidación del Fe (II) en presencia de oxígeno. Hay datos que indican que esta proteína, la ceruloplasmina, funciona fisiológicamente como una ferroxidasa, ayudando así a la movilización del hierro celular antes de su incorpora--ción a la transferrina.

La ceruloplasmina es una metaloenzima que contiene 6 átomos de cobre por molécula, aunque, al parecer, sólo 4 de ellos son esenciales para el sitio activo. Tiene un peso molecular de 132000 y está formada por una sola cadena polipeptídica. Como el cobre se une a la proteína en su estado de oxidación de Cu (II) ésta adquiere un color azul (35).

Por el hecho de que esta enzima contiene cobre y que en condi--ciones fisiológicas funciona como una ferroxidasa, puede decirse -- que la ceruloplasmina actúa como un eslabón entre el metabolismo del hierro y el metabolismo del cobre.

La concentración de ceruloplasmina en el plasma humano de un --adulto es de 27-39 mg/100 ml. En ratas recién nacidas, la concentra--ción de ceruloplasmina es baja y hacia la 3a. semana aumenta casi --15 veces, incrementándose posteriormente de manera gradual. También en el humano la concentración de ceruloplasmina va aumentando duran--te los primeros años de vida (36).

La reacción catalizada por la ceruloplasmina, teniendo al Fe (II) como sustrato es:



Se han propuesto a muchos otros compuestos como posibles factores de oxidación del Fe (II) en el suero. Sin embargo, la reacción catalizada por la ceruloplasmina, a diferencia de otras sustancias, es óptima bajo condiciones fisiológicas, es independiente de la cantidad de  $\text{O}_2$  presente y no es inhibida por la presencia de albúmina (37-39). Estos hechos favorecen la hipótesis de que la ceruloplasmina es la única ferroxidasa efectiva del suero y que, como tal, su actividad es imprescindible en la carga de la transferrina con hierro.

## MATERIALES Y METODOS.

Se utilizaron conejos Nueva Zelanda blancos, del bioterio de la Facultad de Ciencias, UNAM, de los cuales se registró la fecha de apareamiento y la fecha de nacimiento de las distintas camadas, así como el número de crías por camada. Se tomaron conejos de 1, 5, 10, 20, 30, 70 y 90 días de edad. De cada uno se obtuvo el peso y se tomó una muestra de sangre.

### Procesamiento de la sangre.

Las muestras de sangre de conejo se tomaron por punción cardíaca, enjuagando la jeringa con NaCl 0.9% y después con unas gotas de solución de EDTA al 20% en NaCl al 0.9%, pH 7.4, como anticoagulante. Una parte de esta sangre se centrifugó durante 30 minutos a 2800 rpm para separar el plasma del paquete celular. Otra parte se utilizó para medir los siguientes parámetros:

- a) Hematocrito
- b) Concentración de hemoglobina
- c) Número de células blancas y rojas
- d) Porcentaje de reticulocitos

### Hematocrito

Es el porcentaje de volumen ocupado por el paquete celular sanguíneo con respecto al volumen total, después de centrifugar la sangre en un capilar sellado a la flama por uno de sus extremos. Se centrifuga durante 30 minutos a 2800 rpm (41).

### Concentración de Hemoglobina.

Se cuantificó mediante el método de la cianometahemoglobina, pigmento estable que resulta de la reacción entre la metahemoglobina y el cianuro de potasio. La metahemoglobina se forma cuando el ferri-

cianuro convierte al hierro del hemo al estado férrico. Ambas reacciones son rápidas y estequiométricas.

El reactivo que se utiliza es el diluyente de Drabkin, que contiene:

- bicarbonato de sodio ( $\text{Na HCO}_3$ ) 1000 mg
- cianuro de potasio (KCN) ..... 50 mg
- ferricianuro de potasio ( $\text{K}_3\text{Fe} [\text{CN}]_6$ )..... 200 mg
- c. b. p. 1 litro con agua destilada

Se hace una dilución 1:200 de sangre total; la intensidad de color se mide en un espectrofotómetro Zeiss PMQ II a 540 nm. A esta longitud de onda el coeficiente de extinción milimolar de la hemoglobina es de 44. Considerando el peso molecular de esta proteína como de 66 000 g/mol, su concentración en la sangre se expresa como g/100 ml. (41).

#### Conteo de células blancas y rojas

Se utilizó un contador electrónico Haema- Count MK-2s. Para células blancas se usaron diluciones de 1:800 de sangre total en Isotón ( $\text{NaCl}$  7.93 g/l, EDTA 0.38 g/l,  $\text{KCl}$  0.40 g/l,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.19 g/l,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1.95 g/l), agregando unas gotas de hemolizante. Los resultados se expresan en miles de células/ $\text{mm}^3$ .

Para los conteos de células rojas se hicieron diluciones de 1:80000 de sangre en Isotón, expresando los resultados en millones de células/ $\text{mm}^3$ .

#### Tinción para reticulocitos

Se disuelve 1 g de azul de cresilo brillante en 100 ml de una solución que contiene  $\text{NaCl}$  al 0.9% y 0.4 g de citrato de sodio.

Se coloca sobre un papel encerado una gota de muestra de sangre y una gota del reactivo anterior. Se mezcla con un capilar y se deja que la mezcla suba dentro de él. Después de incubar 20 minutos en cámara húmeda, se deja bajar el contenido del capilar, y una vez mezcla

do, se pone una gota encima de un cubreobjetos sobre el cual se desliza otro y se deja secar. Finalmente se acomodan sobre un portaobjetos, fijándolos con aceite de inmersión (41).

### Cuantificación de hierro

Se utilizó el método de Shade modificado por los laboratorios - Merck (42).

Al cambiar bruscamente el pH del plasma con HCl 1N, se remueve el hierro no hémico unido a proteínas, quedando libre y en solución. Las proteínas se precipitan con TCA al 20%, se centrifuga y al sobrenadante se le agrega un exceso de ascorbato de sodio para reducir al hierro y una solución de acetato de sodio al 30% para obtener un pH de 5.5, ya que en estas condiciones el hierro puede reaccionar con el ácido batofenantrolín disulfónico. El producto de esta reacción es un compuesto colorido cuya concentración puede determinarse espectrofotométricamente, leyendo la absorbancia a 535 nm y comparando el viraje de color de la muestra problema con el de una solución de hierro de concentración conocida.

Para estas determinaciones todo el material debe estar lavado con HCl concentrado y enjuagado primero con agua corriente para eliminar el exceso de ácido y después con agua desionizada. Las soluciones se preparan utilizando agua desionizada, la cual se obtiene al pasar agua destilada por un desmineralizador Corning LD 2A.

#### Sustancias:

- solución patrón de hierro (1 mg/ml) \*
- HCl 1N
- Acido tricloroacético (TCA) al 20%
- solución de acetato de sodio al 30%
- ascorbato de sodio \*
- reactivo de coloración (disulfonato de batofenantrolina  $6.8 \times 10^{-4} M$  sal disódica, en amortiguador de fosfato de sodio pH 5.5)\*

\* pertenece al juego de reactivos de Merck.

Se pipetea por duplicado:

	Volumen (ml)		
	Problema	Patrón	Blanco
plasma	0.25	--	--
sol. patrón	--	0.25	--
H <sub>2</sub> O desionizada	0.75	0.75	1.00
HCl 1N	0.50	0.50	0.50

Se mezcla y se deja reposar durante 45 minutos a temperatura ambiente y se agrega:

TCA 20%	0.50	0.50	0.50
---------	------	------	------

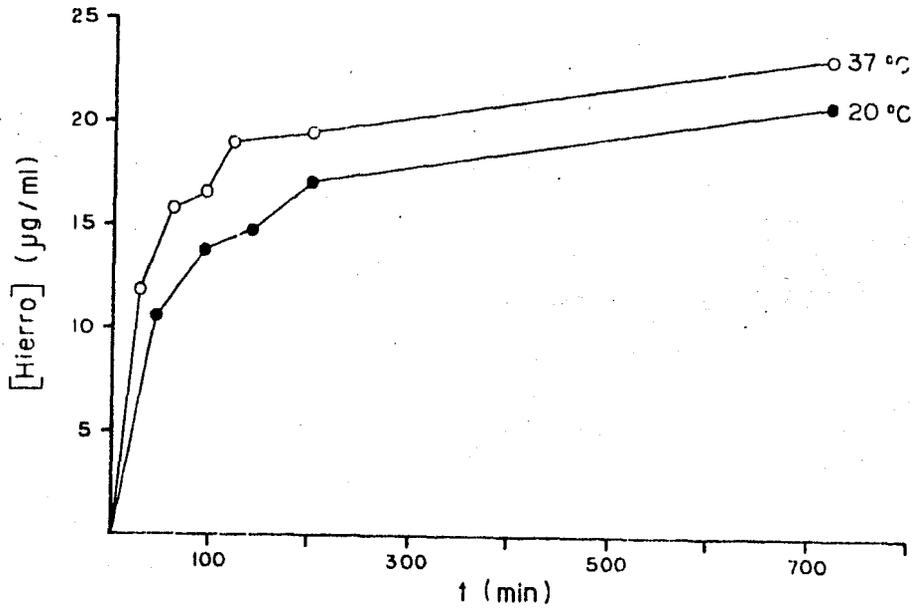
Se mezcla perfectamente y se centrifuga durante 30 minutos a 2700 rpm en frío la muestra problema, descartándose el precipitado. Se pipetea:

sobrenadante, patrón o blanco	1.00	1.00	1.00
acetato de sodio 30%	0.50	0.50	0.50
ascorbato de sodio	~5.0	~5.0 mg	~5.0 mg
reactivo de color	0.50	0.50	0.50

Se mezcla y después de 10 minutos se lee la absorbancia a 535 nm. El contenido en hierro de la muestra problema se obtiene en  $\mu\text{g/ml}$ , -- dividiendo su absorbancia entre la del patrón.

También se midió el contenido en hierro de hemolizados del paquete celular sanguíneo. Se utilizaron muestras de 2 ml de sangre, se --- centrifugaron a 2800 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se separó el plasma, quedando aproximadamente 1 ml de paquete celular, el cual fue lavado 3 veces en solución de NaCl 0.15 M libre de hierro, centrifugando bajo las mismas condiciones pero solamente 10 minutos. - Las células fueron lisadas al agregar dos volúmenes de agua helada y - agitando hasta homogeneizar la solución. Del hemolizado obtenido se - hizo una dilución 1:2 y se tomó 1 ml para la cuantificación de hierro.

Se modificó el tiempo de incubación de la muestra con HCl 1N, ya que se observó que la cantidad de hierro obtenida en los hemolizados - se incrementaba al aumentar este tiempo. Tal incremento se aceleraba -



Gráfica 1. Curva de concentración de hierro libre ( $\mu\text{g/ml}$ ) en hemolizados de sangre de conejo, en función del tiempo de incubación con  $\text{HCl } 1\text{N}$ , a  $20^\circ\text{C}$  (●—●) y a  $37^\circ\text{C}$  (○—○).

al incubar a 37 °C en lugar de hacerlo a temperatura ambiente (ver gráfica 1). En la gráfica puede observarse que a los 120 minutos de incubación a temperatura ambiente y a los 90 minutos a 37°C, los valores de concentración de hierro tienden a estabilizarse y que posteriormente, en ambos casos, la pendiente sufre un cambio relativamente brusco. Las concentraciones aumentan gradualmente de manera lineal en valores cercanos a 20 µg/ml.

Con base en estos datos se eligió incubar las muestras con HCl 1N durante 90 minutos a 37 °C en un baño de temperatura constante.

Después de agregar el TCA al 20% para precipitar a las proteínas se centrifugó a 15000 rpm durante 30 minutos y a 4°C, ya que a 2700 - rpm no se lograba obtener un botón de precipitado compacto.

El resto de la técnica se siguió como está descrita para la determinación del hierro plasmático.

#### Obtención de anticuerpos antitransferrina.

Se obtuvieron anticuerpos antitransferrina para utilizarlos en las determinaciones de la concentración de transferrina en el plasma, como se describe más adelante.

Se utilizó apotransferrina purificada en el laboratorio, a partir de suero de conejos anémicos según se describe en (43).

Las inoculaciones se hicieron en borrego. Para el primer estímulo se inyectó por vía intramuscular una emulsión preparada en un homogenizador Polytron, que contenía un volumen de apotransferrina a una concentración de 9 mg/ml, un volumen de solución salina al 0.9% y dos volúmenes de adyuvante incompleto de Freund. Los siguientes estímulos se hicieron inoculando por vía intradérmica una solución que consistía de una parte de apotransferrina por una parte de solución salina fisiológica, con un volumen final de 2.4 ml. Tales estímulos se dieron con una periodicidad de 1 semana.

Después del 9o. estímulo se obtuvo sangre del borrego mediante punción en la yugular, recogiendo en matraces con cuentas de vidrio para desfibrinar. A partir de este sangrado se alternaron semanal-

mente estímulos con apotransferrina, para mantener el título de anticuerpo, y colecciones de sangre con objeto de purificar la fracción de gamma-globulinas.

Para la purificación de gamma-globulinas de borrego se obtuvo el suero de cada uno de los sangrados anteriores. A un volumen de este suero se le agregó un volumen igual de amortiguador salino de fosfatos (PBS) con un pH de 7.4 y posteriormente se llevó a un 40% de saturación con una solución saturada de sulfato de amonio. El precipitado se resuspende en el mismo amortiguador y se lleva a un 35% de saturación con sulfato de amonio en solución. Se recupera el precipitado y se dializa exhaustivamente contra PBS para eliminar el exceso de sal. Finalmente se liofilizó esta fracción.

#### Determinación de la concentración de transferrina en plasma

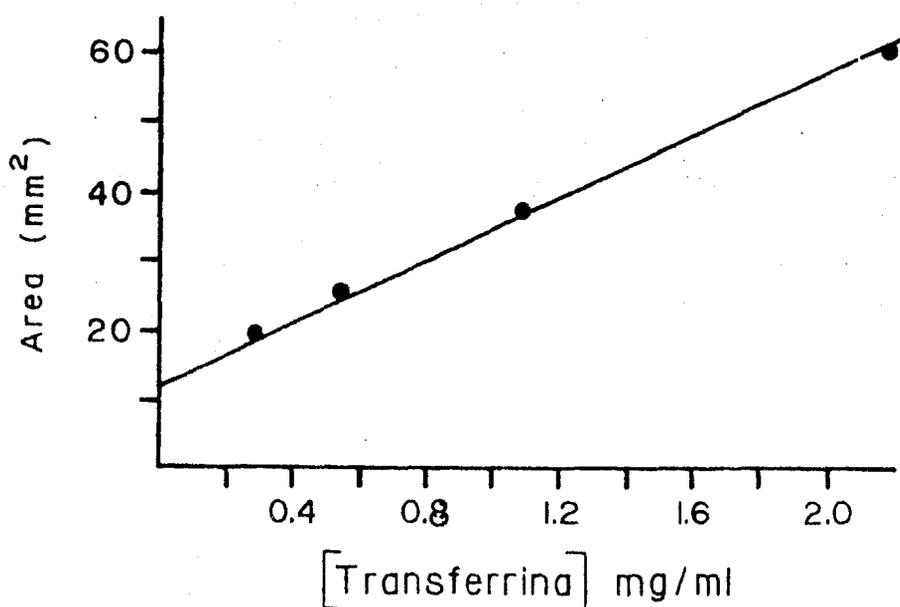
Utilizando los anticuerpos de borrego contra transferrina de conejo, la técnica de Mancini (44) permite obtener datos cuantitativos acerca de la concentración de esta proteína en diferentes muestras del plasma de los conejos.

Se prepara una solución al 3% de agar (Bacto-agar Difco) en amortiguador de Tris-barbituratos pH 8.6, I=0.02 (LKB); se deja fundir el agar a 70°C hasta obtener una solución translúcida. Esta solución se incuba a 57°C en un baño de temperatura constante junto con una solución de anticuerpos antitransferrina con una concentración de 8 mg/ml. De esta mezcla se vacían 4 ml en placas de plástico y se deja solidificar el agar. Se perforan pozos de 3 mm de diámetro con una capacidad de 3 µl. Los restos de gel en el pozo se retiran por succión y el interior se seca perfectamente.

Después de aplicadas las muestras, las placas se dejan en una cámara húmeda y pasadas 24 horas se tiñen y se miden los halos de precipitación formados. Para teñir se utiliza amido negro 10B 0.5% en metanol-ácido acético glacial (9:1) y se destiñe con ácido acético al 7%.

Se hizo una curva patrón con concentraciones conocidas de transferrina para calcular en relación con ella las concentraciones en el

plasma de los conejos de diferentes edades. La curva patrón se hizo a partir de una solución de transferrina pura de conejo con una concentración de 17.4 mg/ml, preparando diluciones seriadas desde 1:8 - hasta 1:64, ya que con estas cantidades se obtuvo un comportamiento lineal al graficar la concentración de transferrina contra el cuadrado del diámetro de los halos de precipitación (tabla 1 y gráfica 2). La ecuación de esta recta está dada por :



Gráfica 2. Curva de concentración de transferrina (mg/ml). Se grafica el cuadrado del diámetro de inmunodifusión como área (mm<sup>2</sup>) contra las concentraciones conocidas de transferrina pura en solución. La recta se ajustó por regresión lineal, siendo su ecuación,  $S = 11.91 + 22.55 [Ag]$  (ver tabla 1).

Tabla 1. Curva Patrón de Concentración de Transferrina.

Se utilizó una solución de transferrina con una concentración inicial de 17.4 mg/ml, haciendo diluciones seriadas a partir de ésta.

dilución	Tf (mg/ml)	diámetro (mm)	Area (mm <sup>2</sup> )
1:8	2.18	7.75	60.06
1:16	1.09	6.10	37.21
1:32	0.54	5.05	25.50
1:64	0.27	4.45	19.80

$$S = S_0 + k [Ag]$$

donde,

$S$  = cuadrado del diámetro del halo (área, en mm)

$S_0$  = ordenada al origen

$k$  = pendiente de la recta

$[Ag]$  = concentración de transferrina (mg/ml)

La ordenada al origen no es 0 y está dada por la capacidad del pozo seco más el volumen de muestra aplicada (45).

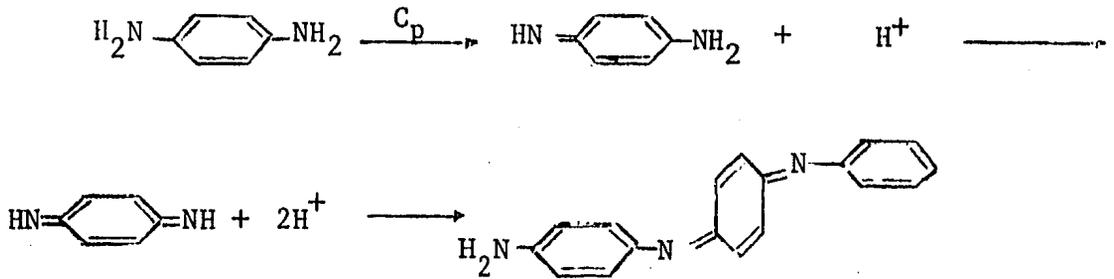
La pendiente de la recta es independiente del tamaño del pozo, pero es inversamente proporcional a la concentración de anticuerpo.

#### Determinación de la actividad de ceruloplasmina

Se siguió el método de Curzon, con algunas modificaciones de Lovstad y otras realizadas en el laboratorio (46).

La técnica se basa en la capacidad de la ceruloplasmina para oxidar compuestos aminados tales como la parafenilendiamina (DPD),

dando un compuesto colorido, la base de Bandrowski, que puede detectarse en el espectrofotómetro. La reacción es:



Base de Bandrowski

Las mejores condiciones para que ocurra esta reacción son que el sustrato se encuentre en exceso y en amortiguador de acetatos 0.2 M, pH 5.5 al que se agrega ortofenantrolina 1 mM con objeto de eliminar trazas de hierro que aumentan la reacción de la enzima sobre el sustrato. Asimismo, a la solución de DPD se le adiciona EDTA en una concentración de 5 mM para evitar la oxidación de este compuesto por trazas de metales.

Se incuba a 37°C y se detiene la reacción con una solución helada de azida de sodio 0.3 mM disuelta en NaCl al 10% después de 15 minutos, ya que dentro de este tiempo la aparición de producto oxidado es lineal, y después de los 25 minutos de iniciada la reacción el color empieza a desaparecer. Por esta misma razón, debe leerse la absorbancia de 550 nm lo más rápidamente posible.

Al igual que para la determinación de hierro en plasma, el material debe lavarse con HCl concentrado y enjuagarse con agua corriente y con agua desionizada. Las soluciones se preparan también con agua desionizada.

Los pasos de la técnica son:

1. Preparación de la mezcla de incubación:

- amortiguador de acetatos 0.2 mM, pH 5.5 ..... 2 ml
- agua desionizada ..... 1 ml
- N, N-dimetilparafenildendiamonio dicloruro 1.7 mM..... 1 ml
- dilución de plasma en NaCl 0.1 M\* ..... 1 ml

Se prepara también un tubo blanco que no contiene plasma sino --  
2 ml de agua.

\* la dilución de 0.1 ml de plasma con 0.9 ml de NaCl 0.1 M contiene

la concentración promedio de plasma donde la reacción enzimática es lineal.

2. Incubación a 37°C en un baño de temperatura constante durante 15 minutos. El momento de agregar el DPD es el tiempo 0 de la reacción.
3. Término de la reacción, adicionando 2 ml de azida de sodio 0.3 mM en NaCl al 10%.
4. Lectura de absorbancia a 550 nm.

## RESULTADOS

La cantidad de conejos utilizada para cada edad se eligió con base en el número de individuos disponibles por camada. En todos los casos se utilizaron conejos que no habían sido sangrados previamente, con excepción de dos de los conejos de 20 días y uno de los conejos de 30 días de edad; estos tres ejemplares habían sido sangrados a los 10 días de edad, por lo cual se obtuvieron datos para ejemplares no sangrados con anterioridad. El número de conejos muestreados en cada día fue:

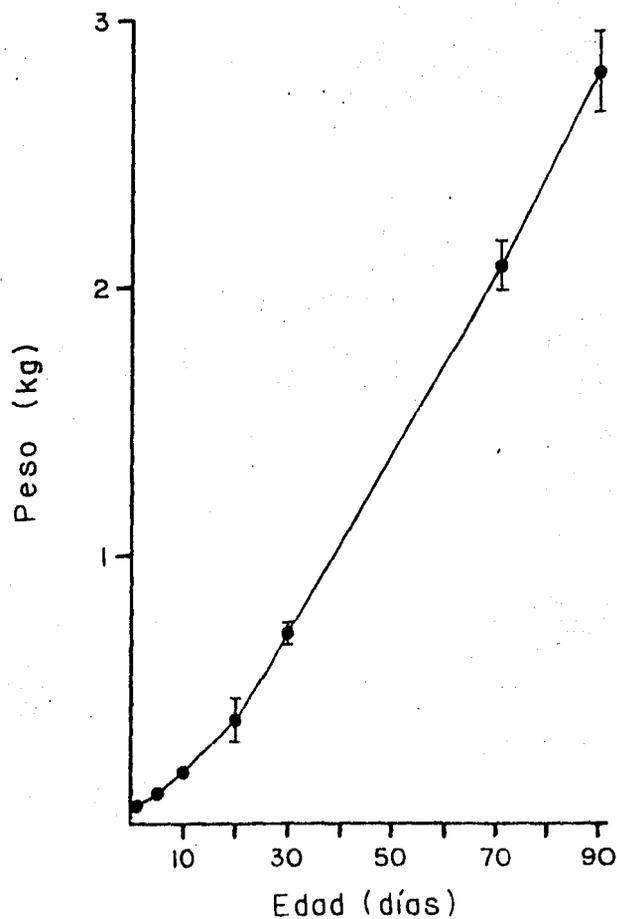
Edad (días)	Número de conejos
1	3
5	5
10	4
20	4
30	2
70	2
90	4

### Crecimiento de los conejos

Antes de tomar las muestras de sangre, los conejos fueron pesados. En la gráfica 3 puede observarse la curva de crecimiento. El peso de los conejos se va incrementando, primero lentamente y después con mayor rapidez, habiendo un cambio de pendiente alrededor del día 20.

### Evaluación de los parámetros hematológicos

Se midieron el hematocrito, la concentración de hemoglobina y el número de células rojas sanguíneas, ya que estos datos proporcionan información directa acerca de las características de las células rojas circulantes y, además, al combinar estos datos entre sí se puede conocer de manera indirecta, el volumen y la cantidad de hemoglobina que contiene en promedio cada célula. Es por ello que a través



Gráfica 3. Curva de crecimiento de conejos de diferentes edades. Se grafica el peso promedio de conejos de la misma edad y su desviación estándar correspondiente (tabla 2).

Tabla 2. Peso de conejos de diferentes edades

Edad (días)	Peso (kg)	$\bar{X}$
1	0.066	0.064 $\pm$ 0.003
	0.060	
	0.067	
5	0.075	0.109 $\pm$ 0.02
	0.095	
	0.115	
	0.135	
	0.123	
10	0.168	0.190 $\pm$ 0.014
	0.192	
	0.195	
	0.207	
20	0.500	0.386 $\pm$ 0.081
	0.350	
	0.280	
	0.415	
30	0.745	0.170 $\pm$ 0.035
	0.675	
70	2.180	2.070 $\pm$ 0.107
	1.965	
90	2.035	2.780 $\pm$ 0.130
	2.890	
	2.700	
	2.620	

de estos parámetros pueden compararse los tipos celulares existentes en la sangre de los conejos recién nacidos con los presentes en la sangre de los adultos.

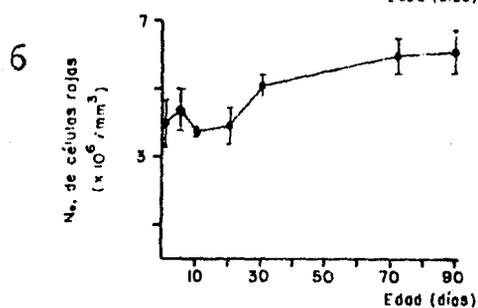
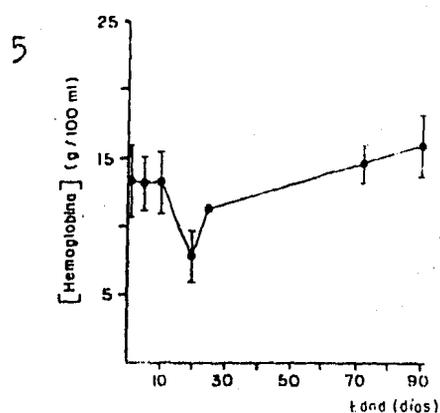
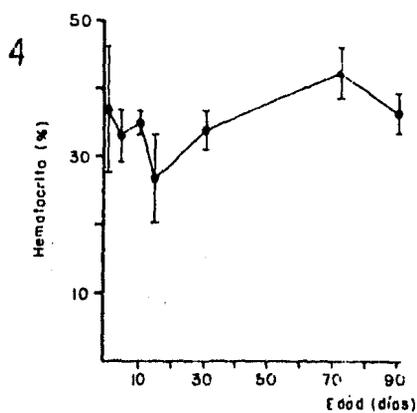
Por otro lado, la observación directa al microscopio nos permite saber si existen características especiales en cuanto al porcentaje y al tamaño de los reticulocitos y los eritrocitos de la sangre de los conejos de los primeros días después del nacimiento. Así, los frotis de sangre teñidos con azul de cresilo brillante, fueron utilizados tanto para calcular el porcentaje de los reticulocitos en circulación, como para medir el diámetro de los reticulocitos y de los eritrocitos.

Hematocrito. El porcentaje de hematocrito se mantiene entre un 35 y un 40%, aproximadamente, habiendo solamente una disminución en el promedio de los conejos de 20 días de edad (gráfica 4). Esto puede deberse a que en este día las células tienen un menor volumen promedio, comparadas con las células del resto de las edades.

Concentración de hemoglobina. El promedio de este parámetro es ligeramente más bajo en los conejos de 1-30 días de edad y a los 70 y 90 días se ha alcanzado el valor del adulto, de unos 15 g/100 ml (gráfica 5). Nuevamente, es en los conejos de 20 días donde existe una disminución de la concentración de hemoglobina.

Número de células rojas (NCR). El NCR de los conejos de 1-20 días de edad es más bajo que el NCR de los adultos, de unos  $6 \times 10^6/\text{mm}^3$ . El cambio de este valor promedio se da, como puede observarse en la gráfica 6, entre los días 20 y 30 de edad.

Porcentaje y número de reticulocitos. Observando al microscopio los frotis de sangre para identificar a los reticulocitos, se hizo el conteo de estas células en los conejos de diferentes edades. Los resultados se muestran en la gráfica 7 y en la tabla 6. A partir de --



Gráfica 4. Porcentaje de hematocrito de conejos de distintas edades (tabla 3).

Gráfica 5. Concentración de hemoglobina (g/100 ml) en sangre de conejos de diferentes edades (tabla 4).

Gráfica 6. Número de células rojas sanguíneas (millones/mm<sup>3</sup>) de conejos de distintas edades (tabla 5).

Tabla 3. Porcentaje de hematocrito en sangre de conejos de diferentes edades.

Edad (días)	Ht (%)	$\bar{X}$
1	43.47	36.94 $\pm$ 9.30
	43.57	
	23.78	
5	32.33	32.98 $\pm$ 3.92
	29.50	
	28.15	
	36.74	
10	38.18	34.94 $\pm$ 1.78
	33.11	
	36.04	
	33.32	
20	37.30	26.70 $\pm$ 6.41
	28.74	
	17.99	
30	35.61	33.69 $\pm$ 2.74
	24.47	
	30.95	
70	36.44	42.00 $\pm$ 3.84
	38.16	
90	45.85	36.06 $\pm$ 3.06
	34.00	
	32.20	
	38.44	
	39.61	

Tabla 4. Concentración de hemoglobina (Hb) en sangre de conejos de diferentes edades.

Edad (días)	Hb (g/100 ml)	$\bar{X}$
1	15.39	13.35 $\pm$ 2.02
	14.08	
	10.59	
5	12.22	13.05 $\pm$ 1.85
	10.65	
	11.95	
	15.45	
	15.00	
10	11.41	13.19 $\pm$ 2.21
	11.50	
	16.86	
	12.99	
20	8.13	7.8 $\pm$ 1.92
	4.80	
	10.17	
	8.10	
30	11.02	11.29 $\pm$ 0.27
	11.56	
70	13.23	14.58 $\pm$ 1.35
	15.94	
90	14.67	16.00 $\pm$ 2.26
	13.77	
	15.87	
	19.69	

Tabla 5. Número de células rojas (NCR) en sangre de conejos de distintas edades.

Edad (días)	NCR ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )	$\bar{X}$
1	4.41	$3.98 \pm 0.71$
	4.55	
	2.98	
5	4.95	$4.38 \pm 0.62$
	3.46	
	5.17	
	4.30	
	4.02	
10	-	$3.72 \pm 0.13$
	-	
	3.59	
20	3.86	$3.89 \pm 0.52$
	4.21	
	3.06	
	4.43	
	3.88	
30	5.33	$5.04 \pm 0.29$
	4.75	
70	5.45	$5.96 \pm 0.51$
	6.47	
90	6.16	$6.10 \pm 0.64$
	5.71	
	7.10	
	5.42	

estos datos y los de NCR, puede calcularse la cantidad de reticulocitos en sangre, en números absolutos (gráfica 8 y tabla 6).

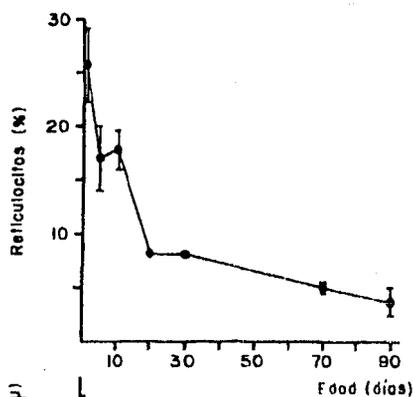
Tanto el número como el porcentaje de reticulocitos en circulación es alto en los conejos de 1 día de edad y va disminuyendo rápidamente hasta el día 20, a partir del cual, ambos parámetros siguen disminuyendo pero más lentamente. El valor de los adultos se encuentra alrededor de un 3%, el cual es casi 10 veces menor al porcentaje de los conejos de 1 día, de más del 25%. Estos valores reflejan que la actividad eritropoyética de la médula ósea es muy elevada en los primeros 20 días de edad y que a partir de este día, la formación de células rojas disminuye considerablemente.

Diámetro de las células rojas circulantes. Utilizando los mismos frotis para reticulocitos, se midió el diámetro de los eritrocitos y de los reticulocitos, ya que esta es la manera más directa de identificar diferentes tipos de células circulantes en la sangre. Los resultados se encuentran en las gráficas 9 y 10 y en la tabla 7.

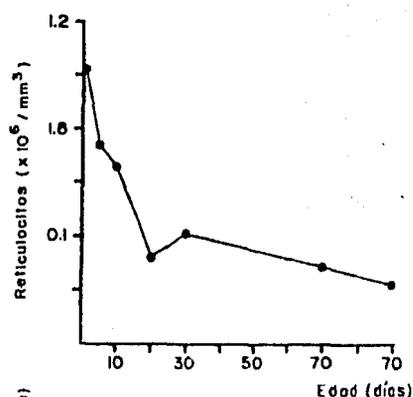
Puede observarse que el diámetro promedio tanto de los eritrocitos como de los reticulocitos es grande en los conejos de 1 día de edad, siendo células de unos 8  $\mu\text{m}$ , y puede decirse que se trata de una población homogénea de células grandes. En cambio, en las siguientes edades, además de que el tamaño promedio de ambos tipos de células es comparativamente menor, se trata de una población heterogénea de células grandes y pequeñas (6.5  $\mu\text{m}$ ), incrementándose al porcentaje de células chicas a medida que aumenta la edad. En los conejos de 70 y 90 días la población vuelve a ser homogénea, pero esta vez se trata sólo de células pequeñas.

VMC, HMC, CMHC. A partir de los valores de hematocrito, concentración de hemoglobina y número de células rojas, pueden calcularse otros tres que dan información acerca de las células sanguíneas en cuanto a su tamaño y a su contenido y concentración de hemoglobina:

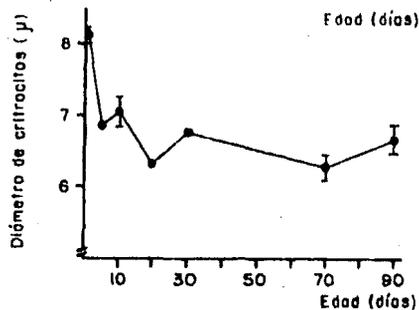
7



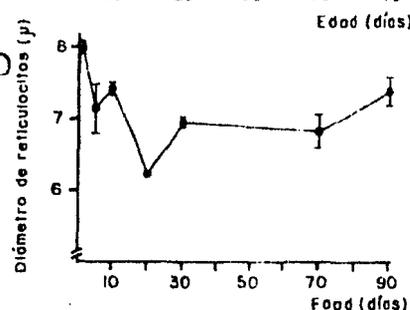
8



9



10



Gráfica 7. Porcentaje de reticulocitos circulantes en sangre de conejos de distintas edades (tabla 6).

Gráfica 8. Número de reticulocitos ( $\text{millones}/\text{mm}^3$ ) en sangre de conejos de diferentes edades (tabla 6).

Gráfica 9. Diámetro ( $\mu\text{m}$ ) de eritrocitos en sangre de conejos - en función de la edad (tabla 7).

Gráfica 10. Diámetro ( $\mu\text{m}$ ) de reticulocitos en sangre de conejos en función de la edad (tabla 7).

Tabla 6. Porcentaje y Número de Reticulocitos en Sangre de Conejos de Diferentes Edades.

Edad (días)	% de reticulocitos	No. de reticulocitos
1	25.70 $\pm$ 3.43	1.02 x 10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup>
5	17.00 $\pm$ 3.00	0.74 "
10	17.85 $\pm$ 3.72	0.66 "
20	8.12	0.32 "
30	8.13	0.41 "
70	5.02 $\pm$ 0.42	0.29 "
90	3.60 $\pm$ 1.22	0.22 "

Tabla 7. Diámetro ( $\emptyset$ ) de Eritrocitos y de Reticulocitos en Sangre de Conejos de Distintas Edades.

Edad (días)	$\emptyset$ ( $\mu$ m) de eritrocitos	$\emptyset$ ( $\mu$ m) de reticulocitos
1	8.11 $\pm$ 0.13	7.99 $\pm$ 0.07
5	6.87 $\pm$ 0.02	7.15 $\pm$ 0.35
10	7.05 $\pm$ 0.21	7.42 $\pm$ 0.09
20	6.33	6.23
30	6.77 $\pm$ 0.05	6.96 $\pm$ 0.07
70	6.28 $\pm$ 0.18	6.83 $\pm$ 0.23
90	6.67 $\pm$ 0.20	7.39 $\pm$ 0.19

1. VMC (volumen medio corpuscular)

$$\frac{\text{volumen de eritrocitos empacados /1000 ml de sangre}}{\text{NCR ( x } 10^6/\text{mm}^3)} = \text{VMC (}\mu\text{m)}^3$$

(gráfica 11)

2. HMC (hemoglobina media corpuscular), que es la cantidad de hemoglobina que contiene, en promedio, cada célula:

$$\frac{\text{hemoglobina (g/1000 ml de sangre)}}{\text{NCR ( x } 10^6/\text{mm}^3)} = \text{HMC (pg)}$$

(gráfica 12)

3. CMHC (concentración media de hemoglobina corpuscular), que es la hemoglobina contenida en las células en relación a su tamaño:

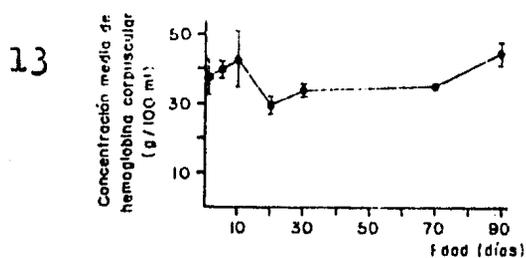
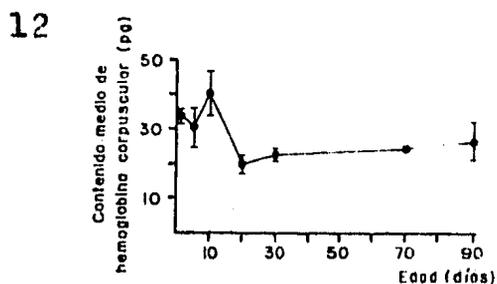
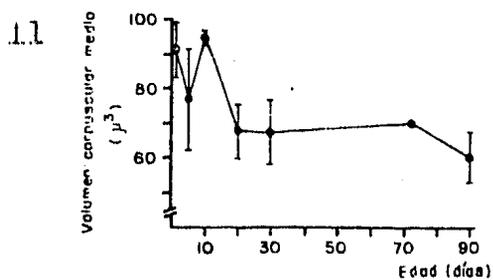
$$\frac{\text{hemoglobina (g/100 ml)} \times 100}{\text{hematocrito (\%)}} = \text{CMHC (g/100 ml)}$$

(gráfica 13)

El VMC de las células de 1-20 días es mayor que el de las células del adulto. El cambio se presenta a los 20 días de edad. El HMC es también mayor en las células de los primeros días, ocurriendo el cambio a los 20 días de edad. La concentración de hemoglobina en las células (CMHC) se mantiene más o menos constante en todas las edades, existiendo en los conejos de 20 días de edad un menor valor promedio. Esto quiere decir que alrededor de este día existe un cambio en las características de las células rojas, teniendo un menor volumen y una menor concentración de hemoglobina.

#### Evaluación de los parámetros cuantificados en el plasma

A partir de los datos obtenidos con los parámetros hematológicos, se puede decir que en los conejos recién nacidos existen poblaciones de células rojas circulantes de diferentes características que las que se encuentran en la sangre de los adultos. El período de formación de



Gráfica 11. Volumen corpuscular medio ( $\mu^3$ ) de células rojas sanguíneas de conejos de diferentes edades (tabla 8).

Gráfica 12. Contenido medio de hemoglobina corpuscular (pg) de células rojas sanguíneas de conejos de distintas edades (tabla 8).

Gráfica 13. Concentración media de hemoglobina corpuscular (g/100 ml) en células rojas de sangre de conejos de distintas edades (tabla 8).

Tabla 8. Valores promedio de volumen medio corpuscular (VMC), hemoglobina media corpuscular (HMC) y concentración media de hemoglobina corpuscular (CMHC) en sangre de conejos de distintas edades.

Edad (días)	VMC( $\mu\text{m}^3$ )	HMC (pg)	CMHC (g/100ml)
1	91.4 $\pm$ 8.29	33.79 $\pm$ 2.02	37.41 $\pm$ 5.18
5	77.1 $\pm$ 14.90	30.36 $\pm$ 5.73	39.54 $\pm$ 2.44
10	94.7 $\pm$ 1.91	40.30 $\pm$ 6.65	42.71 $\pm$ 7.89
20	67.6 $\pm$ 8.12	19.70 $\pm$ 2.66	29.15 $\pm$ 2.39
30	67.4 $\pm$ 9.35	22.51 $\pm$ 1.83	33.67 $\pm$ 1.95
70	70.4 $\pm$ 0.40	24.45 $\pm$ 0.18	34.71 $\pm$ 0.05
90	60.1 $\pm$ 7.58	26.64 $\pm$ 5.63	44.22 $\pm$ 3.24

las células rojas de los adultos debe estar comprendido en las primeras semanas posteriores al nacimiento y debido a esta razón se estudiaron los factores plasmáticos más directamente involucrados en el transporte de hierro durante estas etapas: el hierro no hémico asociado a proteínas, principalmente a la transferrina, la concentración de la transferrina y la concentración de la ceruloplasmina, medida a través de su actividad enzimática de ferroxidasa. De esta manera se podrá comparar cuantitativamente el transporte de este ión metálico en la etapa inmediata postnatal, de gran actividad eritropoyética, con el transporte durante la etapa adulta.

Por otra parte, se estudió también la posible presencia de hierro no hémico en el interior de los eritrocitos de las primeras edades postnatales, ya que podría constituir una reserva de este elemento, adicional a las reservas hepáticas. Debido a esto también se cuantificó hierro libre en hemolizados del paquete celular sanguíneo.

Concentración de hierro no hémico en plasma. Los valores de los niveles de hierro en plasma en un conejo adulto se encuentran alrededor de los 2.0-2.5  $\mu\text{g/ml}$ . El valor promedio para los conejos de 1 día es menor que en los adultos, habiendo una variación grande en los valores individuales (tabla 9), pero las cantidades son siempre más bajas -- que en los adultos. A los 5 y a los 10 días la tendencia es que la concentración de hierro se incrementa, en un período corto de tiempo. A los 20 días el promedio vuelve a disminuir y posteriormente los niveles van aumentando gradualmente (gráfica 14).

Concentración de hierro en hemolizados de paquete celular sanguíneo. Se cuantificó el hierro en el paquete de células de sangre de los conejos de diferentes edades, pero también se midió el hierro en una muestra de hemoglobina purificada, utilizando el mismo método que -- para medir el hierro no hémico en hemolizados (ver Materiales y Métodos) y de esta manera verificar si no se cuantifica el hierro del hemo que podría disociarse bajo estas condiciones. La hemoglobina se obtuvo pasando hemolizado el paquete celular sanguíneo de un conejo

Tabla 9. Concentración de Hierro (Fe) en Plasma de Conejos de Diferentes Edades.

Edad (días)	Fe ( $\mu\text{g/ml}$ )	$\bar{X}$
1	0.83	$0.84 \pm 0.48$
	0.25	
	1.44	
5	1.70	$1.64 \pm 0.48$
	2.48	
	1.67	
	1.26	
	1.08	
10	0.48	$1.65 \pm 0.74$
	1.59	
	2.09	
	2.44	
20	0.42	$0.62 \pm 0.21$
	0.92	
	0.52	
	0.43	
30	0.99	$1.14 \pm 0.15$
	1.29	
70	1.52	$1.61 \pm 0.09$
	1.70	
90	2.70	$2.03 \pm 0.44$
	2.00	
	1.48	
	1.93	

adulto por una columna de Sephadex G-50 en Tris-Cl 50 mM, pH 7.4. La cantidad de hemoglobina era de 13 mg y el hierro cuantificado, 0.42  $\mu$ g. Sabiendo que 1 mg de hemoglobina contiene 3.35  $\mu$ g de hierro, se tiene que el hierro determinado en esta muestra corresponde al 0.95% del que se encuentra teóricamente en la hemoglobina. Todos los valores obtenidos para el hierro en los hemolizados correspondieron, aproximadamente, al 1% del valor teórico de hierro en la hemoglobina. Por lo tanto, no se detectó hierro no hémico en las células rojas de los conejos de las primeras edades.

Concentración de transferrina. La concentración de transferrina en el plasma fue, en los primeros 5 días de edad, un 50% más baja en relación a la de los conejos de mayor edad, siendo el valor promedio adulto, en los conejos de 90 días, de 2.2 mg/ml. El aumento en los niveles de esta proteína se da muy rápidamente y de manera lineal; a los 20 días los valores promedio son ya comparables a los del adulto (gráfica 15 y tabla 10).

Saturación de la Transferrina. A partir de los valores de la concentración de transferrina y de las concentraciones de hierro plasmático, es posible calcular el porcentaje de saturación de la transferrina, - asumiendo que su peso molecular es de 78 000 y que queda cargada con dos átomos de hierro, redondeando el peso de éstos en 112. Así, 78 mg de transferrina se saturan con 112  $\mu$ g de hierro. Los valores de este parámetro reflejan la mayor o menor actividad de la carga y la descarga del hierro desde los tejidos donde éste se absorbe hasta los tejidos donde se utiliza.

Los porcentajes promedio de la saturación de la transferrina se encuentran, en general, entre un 50 y un 60%, aproximadamente (tabla II y gráfica 16), aunque en los conejos de 5 días, este valor sobrepasa el 100% de saturación y, en cambio, en los de 20 días es menor - al 20%. En los conejos de los primeros 20 días de edad es donde pueden observarse mayores variaciones en cuanto a este parámetro.

Tabla 10. Concentración de Transferrina en Plasma de Conejos de Diferentes Edades.

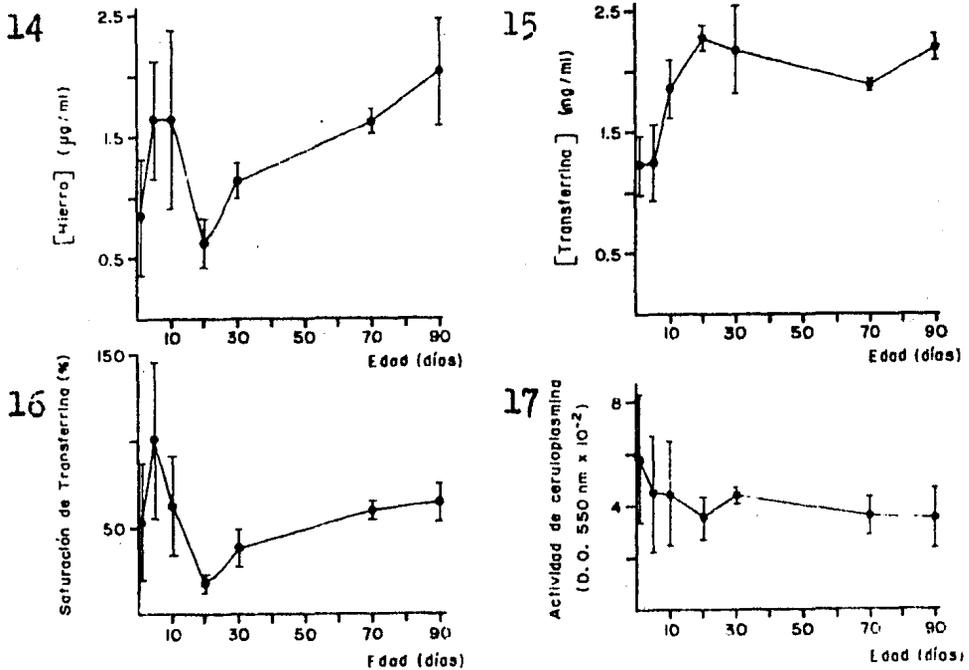
Edad (días)	[Tf] (mg/ml)	$\bar{X}$
1	1.04	1.23 $\pm$ 0.24
	1.57	
	1.08	
5	0.71	1.24 $\pm$ 0.32
	1.32	
	1.19	
	1.30	
	1.70	
10	1.78	1.85 $\pm$ 0.24
	1.91	
	1.52	
	2.18	
20	2.20	2.27 $\pm$ 0.10
	2.42	
	2.30	
	2.16	
30	2.55	2.18 $\pm$ 0.37
	1.81	
70	1.94	1.89 $\pm$ 0.04
	1.85	
90	2.35	2.20 $\pm$ 0.11
	2.27	
	2.11	
	2.07	

Tabla 11. Saturación de Transferrina en Plasma de Conejos de Distintas Edades.

Edad (días)	Saturación de TF (%)	$\bar{X}$
1	55.58	$53.17 \pm 33.4$
	11.09	
	92.85	
5	166.75	$101.41 \pm 43.7$
	130.84	
	97.73	
	67.50	
	44.24	
10	18.78	$62.56 \pm 28.6$
	57.97	
	95.71	
	77.79	
20	13.29	$17.35 \pm 5.3$
	26.47	
	15.80	
	13.86	
30	26.90	$38.26 \pm 11.4$
	49.63	
70	54.56	$59.35 \pm 4.8$
	64.15	
90	80.13	$63.82 \pm 11.1$
	61.36	
	48.85	
	64.93	

Tabla 12. Actividad de Ceruloplasmina (Cp) en Plasma de Conejos de Distintas Edades.

Edad (días)	Cp (D.O. x 10 <sup>-2</sup> )	$\bar{X}$
1	9.15	5.82 ± 2.48
	3.20	
	5.10	
5	3.55	4.48 ± 2.22
	5.95	
	8.10	
	2.30	
	2.50	
10	3.05	4.48 ± 2.02
	2.95	
	4.00	
	7.90	
20	2.70	3.51 ± 0.84
	2.65	
	4.25	
	4.45	
30	4.70	4.40 ± 0.30
	4.10	
70	4.35	3.60 ± 0.75
	2.85	
90	5.50	3.52 ± 1.17
	3.10	
	2.45	
	3.05	



Gráfica 14. Concentración de hierro no hémico ( $\mu\text{g/ml}$ ) en plasma de conejos de distintas edades (tabla 9).

Gráfica 15. Concentración de transferrina ( $\text{mg/ml}$ ) en plasma de conejos de diferentes edades (tabla 10).

Gráfica 16. Porcentaje de saturación de transferrina en conejos de diferentes edades (tabla 11).

Gráfica 17. Actividad de ceruloplasmina (D.O. 550 nm  $\times 10^{-2}$ ) en plasma de conejos de distintas edades (tabla 12).

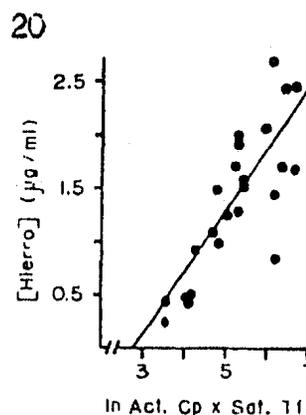
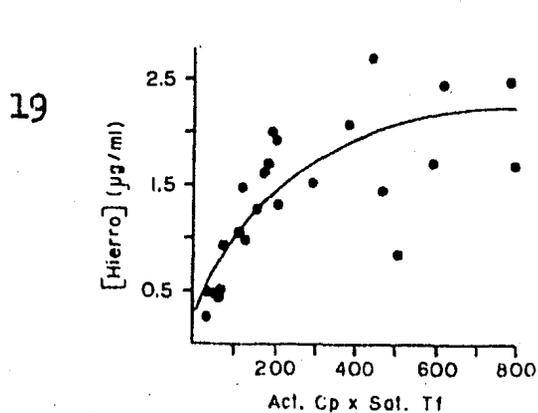
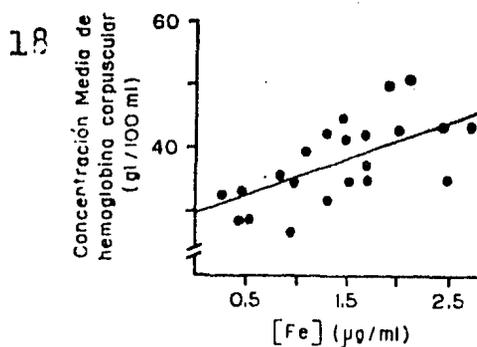
Actividad de la ceruloplasmina. La tendencia observada en la actividad de esta enzima es que, durante los primeros días de edad es más alta que en los conejos de 70 y de 90 días (gráfica 17). Esto puede observarse más claramente en los valores individuales presentados en la tabla 12. De aquí podría interpretarse que en las primeras edades existe una movilización acelerada de las reservas de hierro, lo cual respondería a las necesidades de hierro del organismo en estas etapas, con alta actividad eritropoyética.

#### Correlaciones entre diferentes parámetros.

La saturación de la transferrina está en función de la cantidad y de la disponibilidad del hierro en el plasma. La cantidad, como ya se ha mencionado, depende de la movilización del hierro absorbido y almacenado, según la actividad eritropoyética, principalmente. La disponibilidad está en relación con el estado de oxidación del hierro, para lo cual se requiere de la actividad de ferroxidasa de la ceruloplasmina. Desde este punto de vista, es de esperarse que exista una estrecha correlación entre la concentración de hierro, la concentración y la saturación de la transferrina y la actividad de la ceruloplasmina.

Al graficar los valores individuales de la concentración del hierro plasmático contra los valores del porcentaje de saturación de transferrina multiplicados por los de la actividad de ceruloplasmina, se obtiene la curva que se observa en la gráfica 19. Cerca del origen los valores se acercan a una línea recta, pero para valores mayores, la gráfica tiende a estabilizarse en una meseta. Al tomar el logaritmo natural de los valores del eje de las abscisas, se obtiene la gráfica 20, donde se ha ajustado una recta por el método de mínimos cuadrados. El coeficiente de correlación lineal,  $r$ , de esta recta es de 0.79, con una  $p < 0.001$  de que tal correlación se deba al azar.

También se encontró una correlación entre los valores del hierro plasmático y los de concentración media de hemoglobina corpuscular, como puede observarse en la gráfica 18. En ella, el coeficiente  $r$  es de 0.596, con una  $p < 0.01$ .



Gráfica 18. Concentración media de hemoglobina corpuscular en función de la concentración de hierro plasmático. La recta, cuya ecuación es  $\text{CMHC} = 5.56 [\text{Fe}] + 29.71$ , se ajustó por el método de mínimos cuadrados, teniendo una  $r=0.596$  con una  $p < 0.01$ .

Gráfica 19. Concentración de hierro en plasma en función de la actividad de ceruloplasmina multiplicada por el porcentaje de saturación de la transferrina.

Gráfica 20. Concentración de hierro plasmático contra  $\ln$  (act. de ceruloplasmina x % de saturación de transferrina). La ecuación de la recta ajustada por regresión lineal es  $[\text{Fe}] = 0.58 \times \ln (\text{Act. Cp} \times \text{Sat. Tf}) - 1.63$ . El  $r$  es de 0.79 con una  $p < 0.001$ .

## DISCUSION

Tanto los parámetros hematológicos como los factores determinados en el plasma sanguíneo muestran que durante el período que sigue inmediatamente después del nacimiento en los conejos, ocurren varios cambios, a nivel celular y a nivel bioquímico, siendo por ello un período crítico en el desarrollo del organismo.

Debido a las variaciones observadas en los parámetros medidos, no puede hablarse más que de tendencias de los diferentes valores -- promedio. Tal variabilidad puede atribuirse a diferencias en cuidado y alimentación para cada individuo, que se traducen en distinta -- velocidad de desarrollo. Quizá los aumentos o decrementos en los dis -- tintos factores pueden observarse en todos los individuos alrededor de una edad determinada y no en una edad precisa en todos los casos.

Cambio de poblaciones de células rojas sanguíneas en las primeras -- etapas postnatales. Las mayores fluctuaciones de los valores promedio se encuentran entre el día de nacimiento y los 30 días de edad. El volumen celular medio, calculado a partir del porcentaje de hematocrito y del número de células rojas, junto con las observaciones -- directas hechas al microscopio, indican que la población de las célu -- las rojas circulantes de los conejos recién nacidos es diferente a -- la de los conejos adultos, lo cual coincide con los datos previos de este laboratorio. La población inicial está constituida por eritrocitos y reticulocitos grandes, de más de  $90 \mu\text{m}^3$  de volumen, apareciendo rápidamente, como puede observarse en los frotis de 5 días, células pequeñas, teniéndose así una mezcla de poblaciones. Las células grandes se siguen observando hasta los 30 días, disminuyendo su número y a los 70 días la población consiste sólo de células rojas de -- unas  $65 \mu\text{m}^3$ .

Aparentemente, por las observaciones al microscopio de los frotis del día 5 y del día 10, y como puede observarse en la gráfica 11, no se trata de una sustitución simple de células grandes por células pequeñas, sino que parece estar involucrado un mayor número de poblaciones de diferentes tamaños y densidades. Trabajos posteriores ---

podrían enfocarse al estudio detallado del recambio de poblaciones entre el día 1 y el día 30 de edad en los conejos.

Nivel de eritropoyesis en las primeras edades. Durante este período existe una actividad eritropoyética elevada, lo cual se ve reflejado en el alto porcentaje de reticulocitos encontrado en la sangre de -- los conejos de los primeros días (gráfica 7), así como en el número absoluto de este tipo de células, calculado a partir de dicho porcen-- taje y del número de células rojas.

El porcentaje inicial es de un 26% y sigue siendo relativamente alto, aunque decreciente, hasta el día 30, lo cual concuerda con el período en que se está dando el recambio de poblaciones de células -- rojas sanguíneas.

Condiciones de anemia en los conejos recién nacidos. Los resultados obtenidos señalan que los conejos cercanos al día 20 de edad sufren cambios más o menos drásticos. En la gráfica 3, donde se tiene la -- curva de crecimiento, puede notarse que el día 20 es el punto donde cambia la pendiente, habiendo entonces un crecimiento más rápido a partir de este día. Además, en las gráficas de concentración de he-- moglobina (gráfica 5) y en las de diámetros de las células rojas -- (gráficas 9 y 10), puede observarse claramente que existe una dis-- minución. Es decir que alrededor de este día las células tienen un tamaño promedio menor y que existe un decremento en la concentración de hemoglobina (7.8 g/100 ml, tabla 4).

Halvorsen y Halvorsen (1973) hablan de que en casi todos los -- mamíferos existe una "caída" de la hemoglobina en la primera etapa postnatal (47), designándola como una "anemia temprana". Estos in-- vestigadores sugieren que esta anemia se debe al cambio nutricional que se da en esta edad, ya que es el momento del destete. Ellos han determinado los niveles de eritropoyetina en conejos de esta edad, -- observando un aumento de esta proteína y, además, un incremento sub-- secuento de la eritropoyesis (47).

Holter et al (1984) estudiaron la posible relación del incremento de los niveles de 2, 3-DPG y la presión parcial de oxígeno ( $PO_2$ 50%) con la disminución en la concentración de hemoglobina en conejos recién nacidos (48), pero observaron que la "caída" normal de hemoglobina no era la que inducía el aumento en los niveles de 2, 3-DPG y  $PO_2$ 50%, sino que ambos hechos eran más bien paralelos e independientes, relacionados, probablemente, con el crecimiento y maduración de los animales. Por los resultados de este laboratorio, el aumento en los niveles de 2, 3-DPG puede relacionarse, como ya se ha mencionado, con el recambio de poblaciones celulares sanguíneas, siendo la "caída" de hemoglobina consecuencia de que las células rojas correspondientes a esta edad son, en comparación con el resto, de menor diámetro (gráficas 9 y 10) y sin embargo su número no es mayor (gráfica 6) en relación con los días anteriores, donde existen células cuyo tamaño promedio es mayor. En los días posteriores, las células tienen un menor diámetro, pero su número aumenta. El hecho de que existan células pequeñas y en menor número puede ser la causa de la "caída" de hemoglobina en el día 20 (gráfica 5) y que el aumento en los niveles de 2, 3-DPG sea consecuencia de la aparición de la población nueva de células rojas adultas y no de la disminución de las concentraciones de hemoglobina.

Disminución en el Transporte del Hierro como Posible Explicación de la anemia temprana. En experimentos de los mismos investigadores (48) se comparó un grupo de conejos normales con otro grupo al que inyectaron hierro i.m. El tratamiento con hierro provocó un aumento en las concentraciones de hemoglobina en los conejos próximos a los 20 días de edad. Con esto podría interpretarse que la "anemia temprana" de los conejos recién nacidos, podría adjudicarse a algún factor involucrado con el metabolismo del hierro, ya que los niveles de eritropoyetina, como se mencionó anteriormente, son elevados en estas etapas. Así, debe haber otros factores, además de la eritropoyetina, que estén modulando la formación de las células rojas en este período (47).

Los resultados obtenidos en este trabajo en cuanto a los factores plasmáticos involucrados en el transporte del hierro podrían relacionarse

con la actividad eritropoyética acelerada de las primeras edades. - Puede observarse (gráficas 14 y 15) que tanto los niveles de hierro plasmático como la concentración de transferrina para los conejos - de 1 día de edad, son un 50% menores en relación con los valores ob- tenidos para los conejos de 90 días. Entre el día 5 y el día 10 --- existe un aumento rápido y una disminución posterior en las concen- traciones de hierro. En el mismo período, la concentración de trans- ferrina está aumentando linealmente. Sin embargo, cuando los nive-- les de esta proteína son todavía relativamente bajos, en el día 5, es cuando se presenta el aumento en los niveles de hierro, de tal - manera que la saturación de la transferrina rebasa el 100% (tabla - 11). En general, se asume que el hierro no hémico que se cuantifica en el plasma es el que se encuentra unido a la transferrina, pero - el valor promedio obtenido para los conejos de 5 días, señala que este elemento debe encontrarse también ligado a algún otro factor, - ya que, como se ha dicho, el hierro no puede encontrarse libre, por que formaría complejos tóxicos para el organismo.

Para el día 20, el día de la "caída" de hemoglobina, los nive- les de transferrina son ya los de un adulto, pero, sin embargo, el - porcentaje de saturación es del 17%. La concentración promedio de - hierro es también más baja que en el resto de los días (0.62  $\mu\text{g/ml}$ ). Es decir, que aunque los niveles de esta proteína son los de un --- adulto, el hierro presente no es el suficiente para que la transfe- rrina quede cargada. Así, la anemia observada en los conejos de al- rededor de 20 días de edad se deba probablemente a una disminución - en el suplemento del hierro, como consecuencia del cambio en el ti- po de alimentación.

Mobilización de las reservas de hierro. A pesar de que la cantidad de hierro absorbido en los conejos de 20 días puede disminuir por - el cambio de alimentación, el suplemento de este elemento podría -- ser provisto por los almacenes del hígado, el cual ya contiene una - cantidad considerable de éste en estas etapas (47). Aparentemente,

la limitante de esta movilización no es la actividad de la ceruloplasmina, la cual se mantiene más o menos constante en las diferentes edades (gráfica 17).

Observando los valores individuales (tabla 12), la actividad de ferroxidasa más elevada se obtuvo para los conejos de 1 día de edad. Tomando en cuenta los valores para la concentración de hierro, se observa que éstos aumentan después de este día y, por lo tanto, la actividad elevada de la ceruloplasmina facilitaría la salida de hierro de sus reservas y la carga de la transferrina, que llega a saturarse de hierro.

Es necesario aclarar que las condiciones en las cuales se determinó la actividad enzimática de esta ferroxidasa no fueron las óptimas, ya que los ensayos se hicieron en plasma, donde existe una cierta inactivación de la ceruloplasmina debida a la presencia del EDTA que se utiliza como anticoagulante. Por otro lado, no se está determinando directamente la concentración de proteína, pero puede suponerse que la actividad, aunque en este caso no es la real, es un reflejo de la cantidad presente.

Recientemente en el laboratorio se han obtenido evidencias de que el hierro puede encontrarse unido a la ceruloplasmina en el suero de conejos a los que se les ha provocado una anemia experimental mediante sangrado diario. Esto es interesante, ya que el hierro no unido a la transferrina que, como se ve, también existe en el plasma de los conejos de alrededor de los 5 días de edad, podría estar regulando la actividad de ferroxidasa de la ceruloplasmina y, por consiguiente, la movilización de las reservas de hierro. Es probable que exista siempre una cierta cantidad de hierro unido a la ceruloplasmina, además del que se encuentre ligado a la transferrina y que los cambios en el modo de unión del hierro a la transferrina modifiquen la actividad de esta enzima.

Relación entre los parámetros hematológicos y los parámetros determinados en el plasma. De todo lo anterior podría concluirse que los cambios observados en los primeros días de edad en los conejos, involucran a una gran cantidad de factores sanguíneos, tanto celulares como plasmáticos. Es por esto que la "anemia temprana" de la que ha-

blan Halvorsen y Halvorsen (47) y que se confirma con los resultados obtenidos en este trabajo, no puede adjudicarse a uno o a unos cuantos factores, sino que más bien es el conjunto de todos ellos que se van correlacionando, respondiendo así a todos los cambios fisiológicos y nutricionales que se dan en el período inmediato postnatal. Algunas de estas correlaciones se han derivado de los resultados que aquí se presentan.

La concentración de hemoglobina en las células rojas circulantes está en función de los niveles de hierro no hémico presente en el plasma, lo cual puede deducirse de la correlación de la gráfica 18. Es decir que el hierro que sale de los almacenes se está utilizando directamente en la síntesis de hemoglobina de las poblaciones eritroides nuevas. Por otra parte, este hierro no proviene del interior de las células rojas circulantes, como sucede durante las etapas embrionarias de varias especies de vertebrados (7-12). Probablemente, las células rojas en circulación de las etapas embrionarias del conejo sí contengan hierro no hémico, que sea el utilizado para la síntesis de hemoglobina de las células rojas fetales.

Las gráficas 19 y 20 indican que existe una estrecha correlación entre la actividad de la ceruloplasmina, los niveles de transferrina y las concentraciones de hierro plasmático. El dato de la saturación de la transferrina es, simplemente, la relación  $Fe/transferrina$ . Al multiplicarlo por la actividad de la ceruloplasmina, se está obteniendo la actividad real de ferroxidasa de esta enzima en el plasma que, como se dijo, es algo más baja de la que se determina normalmente en el suero. Así, lo que se está graficando es la relación ceruloplasmina/transferrina contra las concentraciones de hierro, y lo que se encuentra es que mientras esta relación sea alta, la salida de hierro puede aumentar, en tanto que para relaciones más cercanas a 1, la salida de hierro es menor. La mayor parte de los puntos de la parte superior de la recta de la gráfica 20, derivan de los valores de los conejos de los primeros 20 días de edad, es decir, el período en que se está dando el recambio de poblaciones. La movilización de hierro es grande debido a la relación alta de ceruloplasmina/transferrina, -

lo que concuerda con la eritropoyesis elevada que debe existir en la médula ósea. Desde este punto de vista, el factor limitante para la movilización del hierro necesario para la eritropoyesis sería la actividad de la ceruloplasmina más que los niveles de transferrina.

Otro de los factores reguladores de la movilización del hierro es la ferritina, no estudiada en este trabajo. Probablemente, el momento del destete traiga como consecuencia una disminución más o menos drástica en el suplemento y la absorción del hierro y que por -- ello, a pesar de que las reservas sean suficientes y de que la relación ceruloplasmina/transferrina sea la adecuada, no exista una movilización rápida del hierro hacia el plasma, lo cual podría estar modulado por el estado y la concentración de la ferritina en los sitios de absorción (intestino) y almacenamiento (hígado) del hierro. El resultado de esto podría ser la "anemia" observada alrededor del día 20 y la disminución en los niveles de hierro y en la saturación de la - transferrina.

## CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo pueden resumirse en los siguientes puntos:

1. La actividad eritropoyética en los conejos recién nacidos es --- muy elevada en comparación con la de edades posteriores.
2. Existe un recambio de poblaciones celulares sanguíneas durante los primeros 30 días de edad.
3. La población inicial es homogénea y consiste de células de unos-  $8 \mu\text{m}^3$  de diámetro y posteriormente y en un período relativamente corto, aparecen células pequeñas, habiendo entonces una mezcla de poblaciones celulares. Hacia los 70 días, la población consiste únicamente de células de alrededor de  $6.5 \mu\text{m}^3$  de diámetro.
4. El momento crítico del recambio de poblaciones, indicado por los parámetros hematológicos, se presenta alrededor del día 20 de edad, que corresponde con el término de la lactancia. Durante este mismo período existe una disminución en los niveles de hierro plasmático y en el porcentaje de saturación de la transferrina.
5. La concentración de hierro y los niveles de transferrina son más bajos en los conejos recién nacidos en comparación con los existentes en los adultos.
6. Los mecanismos para movilizar el hierro de sus almacenes (actividad de la ceruloplasmina) y los mecanismos para transportarlo -- (transferrina) se encuentran coordinados, respondiendo de esta manera a los requerimientos altos de hierro de la médula ósea - eritropoyética en las primeras etapas postnatales.

## REFERENCIAS

1. Ingram, V. 1972, *Nature*. 235:338-339.
2. Wood, W.G. 1976. *Br. Med. Bull.* 32 (3): 282-286.
3. Kovach, J., Marks, P., Russell, E., Epler, H. 1967. *J. Mol. Biol.* 25: 131-142.
4. Kitchen, H., Brett, I. 1974. *Annals New York Academy of Sciences.* 653-671.
5. Huehns, E., Farooqui, A.M. 1975. *Nature* 254: 335-337.
6. Bard, H., Shapiro, M. 1979. *Medical Research Council of Canada.*
7. Theil, E.C. 1973. *J. Biol. Chem.* 248(2): 622-628.
8. Theil, E.C. 1975. *Dev. Biol.* 46: 343-348.
9. Brown, J.E. Theil, E.C. 1978. *J. Biol. Chem.* 253 (8): 2673-2678.
10. Theil, E.C. 1978. *J. Biol. Chem.* 259 (9): 2902-2904.
11. Theil, E.C., Tosky, G.M. 1979. *Dev. Biol.* 69: 666-672.
12. Theil, E.C., Brenner, W.E. 1981. *Dev. Biol.* 84 (2): 481-484.
13. Barnes, R., Connelly, J.L., Jones, O.T. 1972. *Biochem. J.* 128: 1043-1055.
14. Aisen, P., Listowski, I. 1980. *Ann. Rev. Biochem.* 49: 357-393.
15. Prockop, D.J. 1979. *Fed. Proc.* 30 (3): 984-990.
16. Spiro, T.G., Saltman, P. 1974. *Inorganic Chemistry en "Iron in Biochemistry and Medicine"*. Academic Press. Jacobs, A., Worwood, M. edits. 1-28.
17. Neilands, J. 1981. *Ann. Rev. Biochem.* 50: 715-731.
18. Turnbull, A. 1974. *Iron Absorption en "Iron in Biochemistry and Medicine"*. Academic Press. Jacobs, A. Worwood, M. edits. 369-403.
19. Jacobs, A., Worwood, M. *Iron Absorption: Present State of the Art.*
20. Katz, J. 1970. *Transferrin and its functions on the Regulation of Iron Metabolism. Vol. 1. Red Cell Production.* 539-566.
21. Quesenberry, P., Levitt, L. 1979. *Medical Progress.* 301 (14): 755-759.
22. Quesenberry, P., Levitt, L. 1979. *Medical Progress.* 301 (15): 819-821.
23. Lessin, L., Bessis, M. *Morphology of the Erythron.*

24. Erslev, A.J. Production of Erythrocytes.
25. Iacopetta, B., Morgan, E., Yeoh, G. 1982. *Biochim. Biophys. Acta.* 687: 204-210.
26. Zschocke, R.H., Bezdorovainy, A. 1974. *Arzneim-Forsch. (Drug Res.)* 24 (5): 726-737.
27. Harris, D., Aisen, P. 1975. *Biochemistry* 14 (2): 262-268.
28. Pollack, S., Campana, T. 1981. *Biochim. Biophys. Acta* 673: 366-373.
29. Fletcher, J., Huehns, E.R. 1968. *Nature.* 218: 1211-1214.
30. Awai, M., Chipman, B., Brown, E. 1975. *J. Lab. Clin. Med.* 85 (5): 769-784.
31. Banyard, S.H., Stammers, K., Harrison, P.M. 1978. *Nature.* 271: 282-284.
32. Hoy, T.G., Harrison, P.M. 1976. *Br. J. Haematol.* 33: 497-504.
33. Birgegard, G., *Acta Universitatis Upsaliensis.* 1984.
34. Lynch, S.R., Lipschitz, D.A., Bothwell, T.H., Charlton, R.W. 1974. Iron and the Reticulo-endothelial System en "Iron in Biochemistry and Medicine" Academic Press. Jacobs, A., Worwood, M. edits. 563-587.
35. Frieden, E. 1980. Multifunctions of ceruloplasmin en "Biological Roles of Copper". Ciba Foundation Symposium. 93-125.
36. Roeser, H. et al. 1970. *J. Clin. Inv.* 49: 2408-3417.
37. Osaki, S. et al. 1966. *J. Biol. Chem.* 241 (12): 2746-2751.
38. Harris, D. 1973. *Biochim. Biophys. Acta* 329: 156-158.
39. Frieden, E., Hsieh, H. 1976. *Advances in Enzimology.* 44: 187-236.
40. Cárdenas, A. 1984. Tesis profesional en preparación. Fac. de Ciencias, UNAM.
41. Wintrobe, M.M. *Clinical Hematology.* Lea and Febiger. 5a. ed. 1962. 1186 p.
42. Shade, A.L., Oyama, J., Renhart, R.W., Miller, J.P. 1954. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 87: 443.
43. Alba Lois, L., Velázquez, P., Pulido, G., Martínez-Medellín, J. Descripción de un método sencillo para la purificación de la transferrina. XIII Reunión Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica, A.C., Aguascalientes, Ags. 1980.
44. Mancini, G., Carbonara, A.O., Heremans, J.F. 1965. Immunochemical quantitation of Antigens by Single Radial Immunodifusion.

45. Garvey, J.S., Gremer, N.E., Sussdorf, D.H. 1977. Methods in Immunology. W.A. Benjamin, Inc. 3a. ed. 545 pp.
46. Velázquez, M.P. 1984. Estudio sobre la Ceruloplasmina y su posible papel en el Metabolismo del Hierro de conejos hechos anémicos por sangrado. Tesis Profesional. Fac. Ciencias, UNAM.
47. Halvorsen, K., Halvorsen, S. 1974. *Pediat. Res.* 8: 176-183.
48. Holter, P.H., Halvorsen, S., Refsum, H. 1984. *Pediat. Res.* 18(2): 154-157.