

156
24^o



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

DETERMINACION DE LAS RESERVAS DE HIERRO
EN EL HIGADO DE CONEJOS SUJETOS A UNA
ANEMIA CRONICA POR SANGRADO DIARIO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

BIOLOGO

PRESENTA:

EPIFANIO QUIROZ



MEXICO, D. F.

FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: "Determinación de las reservas de hierro en el hígado de conejos sujetos a una anemia crónica por sangrado diario"

realizado por EPIFANIO QUIROZ

con número de cuenta 7225684-8 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Alejandra Mainero del Paso
DRA./ALEJANDRA MAINERO DEL PASO

Propietario

DRA LUISA ALBA LOIS *Luisa Alba Lois*

Propietario

M. EN C. LILIA YOLANDA BENAVIDES PLASCENCIA *Lilia Yolanda Benavides Plascencia*

Suplente

DR. HECTOR DE JESUS MAYANI VIVEROS *Hector de Jesus Mayani Viveros*

Suplente

DR. RENE DE JESUS CARDENAS VAZQUEZ *René de Jesús Cardenas Vazquez*

Alejandro Martínez Mena
M. EN C. ALEJANDRO MARTINEZ MENA

SECRETARÍA GENERAL
DE LA FACULTAD

ESTE TRABAJO SE REALIZÓ BAJO LA TUTORIA
DEL DR. JAIME MARTÍNEZ MEDELLÍN, EN EL
LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR DE
LA FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM.

A mi madre **Juana Quiroz de Flores**, por traerme a este mundo
tan maravilloso.

A **Gonzalo Flores** mi padre, que me ayudo en todos los aspectos
para que yo estudiara.

A mis hermanos **Guadalupe y José**

AGRADECIMIENTOS

A **Alejandra**, que me inicio en este hermoso campo de la hematología y por sus atinados consejos a lo largo del experimento y por la amistad que me brindo

A **Jaime †**, por habeme brindado la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por sus enseñanzas y su amistad.

A **Lichi**, por su apoyo, motivación y acertados consejos para poder concluir esta tesis, y por la gran amistad que me ofrecio.

A **Victor**, por sus clases tan amenas y su amistad.

A **Rene**, por sus consejos, ayuda y la revisión de este manuscrito.

A **Hector**, por las críticas y correcciones que le hizo a este trabajo. Por la camaradería que me brinda.

A la **Dra. Annie Pardo Semo** y al **Dr. Alfonso Torre Blanco**, por las facilidades que me brindaron en el prestamo de algún equipo o aparato para la realización de mi tesis.

A todos mis compañeros que de una forma u otra han intervenido en mi formación.

A tí Concepción, por el apoyo moral que me has dado
para poder concluir está tesis, por el cariño y amistad
que me has brindado, gracias.....

A la memoria de Jaime Martínez Medellín.

Un gran maestro y un excelente amigo.....

I N D I C E

I. INTRODUCCION

- 1.0 EL HIERRO
- 1.1 FUENTES Y REQUERIMIENTOS DE HIERRO
- 1.2 LA ABSORCION DEL HIERRO
- 1.3 ALMACENAMIENTO DE HIERRO
- 1.4 EXCRECION DEL HIERRO
- 1.5 TRANSPORTE DE HIERRO
- 1.6 FUNCION DE ALGUNAS PROTEINAS QUE CONTIENEN HIERRO
 - 1.6.1 TRANSFERRINA
 - 1.6.2 FERRITINA
 - 1.6.3 HEMOSIDERINA
- 2.0 LA ERITROPOYESIS
- 3.0 ANEMIA POR DEFICIENCIA DE HIERRO

II. ANTECEDENTES GENERALES

III. OBJETIVO

IV. MATERIALES Y METODOS

- 4.1. INDUCCION DE LA ANEMIA
- 4.2. MEDICION DE PARAMETROS HEMATOLOGICOS
- 4.3. OBTENCION DEL HIGADO
- 4.4. DETERMINACION DE HIERRO EN HIGADO
 - 4.4.1 PROCESAMIENTO DEL HIGADO
 - 4.4.2 ANALISIS DEL HIERRO EN HIGADO
- 4.5 ANALISIS ESTADISTICO

V. RESULTADOS Y DISCUSION

- 5.1. COMPORTAMIENTO DE LOS PARAMETROS HEMATOLOGICOS
- 5.2. CONTENIDO DE HIERRO EN HIGADO

VI. CONCLUSIONES

VII. BIBLIOGRAFIA

VIII. APENDICE

I. INTRODUCCION

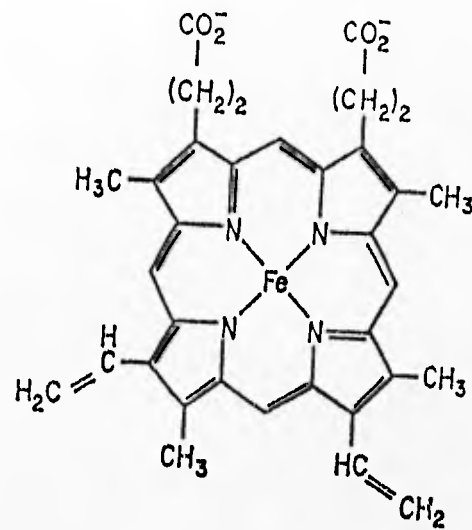
Sabemos que los vertebrados estan constituidos por varios tejidos, unos de ellos son el sanguíneo y el hematopoyético, la sangre en estado natural presenta las siguientes características: es líquido lo que le permite circular por todo el organismo a través de los vasos sanguíneos sin ningún problema, es viscoso, presenta una coloración roja y, la sangre después de unos minutos de estar expuesta al aire o *in vitro* se coagula adquiriendo una consistencia gelatinosa.

La sangre es un tejido que despues de centrifugar muestra dos fases: una líquida denominada suero y/o plasma que contiene una gran cantidad de proteínas, hormonas, lípidos, azúcares, minerales, iones y agua; y otra fase denominada paquete celular en la que encontramos tres tipos celulares: plaquetas, leucocitos y eritrocitos.

Los eritrocitos son las células mas abundantes del tejido sanguíneo, ésto se debe a la función que realizan: son las encargadas de proveer de oxígeno a los demas tejidos del organismo para realizar las diversas funciones metabólicas, otra función de los eritrocitos es transportar el bióxido de carbono a los pulmones e intercambiarlo por oxígeno. Estas funciones son realizadas directamente por la hemoglobina que se encuentra en el interior de eritrocito, dicha proteína está formada por cuatro cadenas polipeptídicas, cada una de estas cadenas posee un grupo hemo, que le da el color rojo a la sangre. Este grupo hemo consiste de un anillo de átomos de carbono, nitrógeno e hidrógeno denominado porfirina, con un átomo de hierro en el centro de la cadena. La parte orgánica llamada protoporfirina, está compuesta por cuatro anillos pirrólicos los cuales estan enlazados por el grupo meteno para formar al anillo tetrapirrólico, y cuatro grupos metilo, dos vinilo y dos de ácido propiónico que se enlazan al anillo porfirínico (Figura 1). Estos compuestos se pueden arreglar en diferentes formas pero sólo uno de estos isómeros, el llamado protoporfirina IX, está presente en los sistemas biológicos.

Cada átomo de hierro se encuentra enlazado al anillo de porfirina por cuatro sitios, cada uno de ellos corresponde a un átomo de nitrógeno. El hemo está embebido en una abertura presente en la cadena polipeptídica de la hemoglobina cerca de la superficie de la molécula. La interacción molecular del hemo con la proteína es bastante compleja, ya que involucra alrededor de 90 contactos de Van der Waals. Se sabe que la mayoría de los residuos de la cadena polipeptídica que estan en contacto con el grupo hemo son invariables, por lo que se puede inferir que las interacciones

FIGURA 1



GRUPO HEMO

Se muestra la estructura química de el anillo tetrapirrólico y los distintos grupos sustituyentes así como el núcleo de Fe⁺².

Tomado de Spiro, T. G; Saltman, P (1974). Inorganic Chemistry in Iron Biochemistry in Medicine Academic Press. Jacobs, A, Worwood, Edts. 1-122

con el hemo son vitales para su función. Como en la mayoría de los compuestos de hierro, el grupo hemo se combina por si mismo con el oxígeno tan fuertemente que el enlace una vez formado es difícil de romper debido a que se forma un compuesto intermediario con lo cual la molécula de oxígeno forma un puente entre los átomos de hierro de los demás hemos. En la hemoglobina los pliegues de la cadena polipeptídica evitan la formación de dicho puente mediante el aislamiento del hemo en cadenas separadas. Además, en la proteína el hierro está unido a un átomo de nitrógeno del aminoácido histidina F8, el cual cede cargas negativas que capacitan al hierro a formar un enlace débil con el oxígeno, de suerte que la reacción con el oxígeno es reversible.

La asociación de la hemoglobina con el oxígeno tiene propiedades fascinantes como resultado de su capacidad de combinación con el oxígeno. Básicamente la molécula funciona absorbiendo oxígeno allí donde la presión de este gas es alta y lo desprende donde la presión es baja. Esto de un modo sencillo explica cómo el oxígeno es transportado desde el pulmón de los vertebrados donde la presión es alta, a las células de los diversos tejidos en donde la presión es más baja.

1.0 EL HIERRO

La gran mayoría de los vertebrados, principalmente los mamíferos, presentan un sistema de almacenamiento de hierro, el cual está representado por una proteína almacenadora de este ión metálico que se conoce como ferritina. Esta proteína se encuentra en mayor proporción en el hígado, a donde el hierro es llevado por otra proteína, la transferrina, cuya función es transportar el hierro desde los sitios de absorción y llevarlo a los lugares de utilización, principalmente a médula ósea para las nuevas células rojas, y a sitios de almacén como el hígado así como a otras muchas células para la formación de citocromos.

El hierro es el elemento número 26 de la tabla periódica, su masa atómica es 55.85 daltones y pertenece al grupo VIII B. El hierro en solución acuosa presenta dos estados de oxidación Fe^{2+} dando productos ferrosos y Fe^{3+} originando compuestos férricos. El hierro es el segundo metal más abundante después del aluminio y el cuarto elemento más abundante en la corteza terrestre (1,3,5).

Este ión metálico se encuentra distribuido en la naturaleza en una gran diversidad de especies de plantas, animales y en algunos organismos unicelulares. Está unido a proteínas específicas como fitoferritina y fitosiderina que se localizan en plantas con flores y en hongos. La hemeritrina es una proteína no hémica, pues carece de porfirina a pesar de presentar hierro y se encuentra en fluidos circulatorios de algunos anélidos, y un género de braquiópodos *Lingula*.

La clorocruorina es una proteína plasmática de color verde de función respiratoria que presenta un grupo hemo, y se encuentra en el celoma de algunos anélidos marinos sedentarios.

La hemocianina es otra proteína respiratoria que tiene cobre no ligado a la porfirina y se localiza en fluidos circulatorios de algunos moluscos y crustáceos.

La mioglobina, proteína que almacena oxígeno, tiene un grupo hemo y se encuentra ampliamente distribuida en las células musculares de animales desde los moluscos hasta el hombre.

La hemoglobina aparece en microorganismos tan primitivos como las levaduras, en algunas especies de *Paramecium* y en muchos invertebrados. También es común encontrarla en algunos anélidos, nemertinos, en crustáceos tales como la *Daphnia*, en algunos insectos, algunos moluscos y principalmente en los vertebrados (8,10,14). Se ha encontrado incluso en células vegetales, principalmente en la raíz de ciertas plantas de la familia de las leguminosas, que contienen una forma algo diferente a la molécula de hemoglobina denominada leghemoglobina (6,7,8).

Así vemos que el hierro es de distribución universal presentándose en todos los vertebrados, siempre unido a proteínas específicas, localizándose en diversos sitios: en suero y/o plasma sanguíneo, ligado a transferrina, ferritina, hemopexina; en varios órganos tales como: hígado, bazo y riñón; en músculo esquelético y cardíaco, en la médula ósea y en células rojas (13,14.).

1.1. FUENTES Y REQUERIMIENTOS DE HIERRO

Las principales fuentes de hierro son las vísceras de animales: hígado, riñón, corazón y bazo. También destacan por su contenido de hierro las carnes y pescados así como la yema de huevo y dentro de los vegetales: los cereales, frutas, legumbres, verduras y hortalizas; inclusive los utensilios empleados para cocinar los alimentos pueden ser una fuente de hierro (4,20). Con respecto a los requerimientos diarios de hierro en el humano, éstos están determinados por los siguientes factores: el crecimiento de los tejidos, la síntesis de hemoglobina, la pérdida de hierro a través de la orina, heces, sudor y en la mujer, las pérdidas adicionales por la menstruación, gestación y lactancia. Los requerimientos para el humano oscilan entre 10 y 18 mg de hierro diario (18,20).

1.2. LA ABSORCIÓN DEL HIERRO

Sólo una pequeña cantidad del hierro que se ingiere es absorbido esto es, en una dieta ordinaria sólo se absorbe de un 10 a 12 %. En tanto los lactantes y niños pequeños absorben un mayor porcentaje con respecto a los adultos, los niños con una deficiencia de este metal absorben dos veces más que los niños sanos (21,22).

El hierro se absorbe fundamentalmente en el duodeno y parte del yeyuno e ileon. La mayor parte del hierro que está presente en los alimentos se encuentra en estado de hierro férrico (Fe^{3+}) ya sea como hidróxido férrico o como compuestos orgánicos férricos. El ácido clorhídrico del jugo gástrico y otros ácidos orgánicos de la dieta, son los que intervienen en la ruptura de los compuestos que contienen hierro, y que originan iones férricos libres y hierro orgánico inestable (4,20).

Las sustancias reductoras que están presentes en la dieta como el ácido ascórbico y/o grupos sulfhidrilo, convierten al cloruro férrico en hierro ferroso soluble, el cual es más fácil de absorber. Los péptidos y aminoácidos procedentes de la digestión de las proteínas forman quelatos de hierro ferroso y férrico aumentando así su absorción. Existen otras sustancias estabilizadoras del hierro que promueven su biodisponibilidad y son las mucoproteínas de las secreciones gástricas. Por otro lado, los compuestos como fosfatos, carbonatos, oxalatos, bicarbonato pancreático y las fibras vegetales, unen hierro formando complejos relativamente insolubles los cuales provocan una disminución en su absorción (4,21). La dieta diaria de un adulto medio en los países desarrollados contiene de 10 a 15 mg de hierro, la mayoría en forma férrica. La reducción a la forma ferrosa, al tipo de hierro que es absorbido, se debe a la reacción ácida en el estómago y en la parte alta del intestino delgado, además de la del ácido ascórbico y otras proteínas reductoras. El hierro es absorbido principalmente en la parte alta del intestino delgado y la cantidad de este metal que se absorbe depende sobre todo de la regulación de su absorción a nivel de la mucosa.

Normalmente se absorbe menos del 10 % del hierro ingerido, ya que el mecanismo de absorción está influenciado por algunos factores como la cantidad y la naturaleza del hierro en el intestino. Cuando se ha absorbido el hierro, éste es transportado a través del plasma en la forma férrica, unido a una fracción de la globulina β -1 y conducido hacia las células reticuloendoteliales del hígado, la médula ósea y el bazo, donde es almacenado en la forma de ferritina y hemosiderina. Desde estos depósitos, el hierro es transferido hasta la médula ósea para la síntesis de hemoglobina (20).

1.3. ALMACENAMIENTO DE HIERRO

El hierro total almacenado en el humano adulto de 70 kg, comúnmente está en el rango de 600 a 1600 mg y constituye del 16 al 25 % del hierro total del organismo. Este hierro es almacenado como ferritina y como hemosiderina en las células fagocíticas del sistema reticuloendotelial del hígado, bazo y médula ósea. Tanto el hierro de la ferritina como el de la hemosiderina pueden ser reutilizados para la síntesis de moléculas que requieran hemo (21).

El hígado es uno de los órganos de mayor tamaño del cuerpo de los vertebrados, está formado por cuatro lobulillos y constituye del 3 al 4 % del peso corporal total. Contiene principalmente dos tipos de células, las más abundantes llamadas hepatocitos de origen parenquimatoso constituyen el 90 % del peso del órgano. La ferritina se encuentra principalmente en estas células y en las células de Kupffer que conforman el otro 10 % del volumen total de este órgano. En las células de Kupffer se acumula también la hemosiderina (14,21). El hígado está ubicado por debajo del diafragma, con el cual se relaciona, y ocupa el espacio superior derecho del abdomen. El hígado tiene una irrigación sanguínea especial, puesto que recibe sangre arterial y venosa. Por la vena porta ingresa al hígado sangre venosa desde el tracto gastrointestinal, el bazo y el páncreas, la sangre venosa contiene casi todas las sustancias absorbidas desde el intestino. El hígado también recibe la arteria hepática, que le entrega sangre arterial, este órgano desempeña una cantidad extraordinaria de funciones de diferentes tipos como son: almacenar hierro y glucosa y sintetizar proteínas. En estado embrionario produce células sanguíneas y esta función desaparece al poco tiempo del nacimiento. También actúa como desintoxicador, ya que en las células hepáticas se encuentran las vías enzimáticas encargadas de la eliminación de los compuestos tóxicos del metabolismo como el amoníaco o el exceso de lactato (27).

1.4. EXCRECIÓN DEL HIERRO

El organismo tiene una capacidad limitada para excretar hierro excepto cuando existen hemorragias. También hay que tener presente que el hierro que es liberado de la hemoglobina de los eritrocitos senescentes es conservado y reutilizado. La excreción diaria de hierro en humanos es de 1 mg en hombres y mujeres posmenopáusicas, de esta cantidad 0.1 mg se excreta por medio de orina y aproximadamente 0.6 mg en heces a partir de células mucosas descamadas, bilis y pequeñas pérdidas sanguíneas. El resto se pierde a través de piel como células descamadas y sudor. En la mujer adulta se pierde en promedio de 25 a 60 ml de sangre durante la menstruación, esto representa una pérdida de 12 a 29 mg de hierro aproximadamente por cada ciclo menstrual (20,21).

1.5. TRANSPORTE DEL HIERRO

El hierro cuando abandona la mucosa intestinal lo hace en forma ferrosa (Fe^{+2}) y en el plasma se convierte a férrico (Fe^{+3}), esta conversión es catalizada por una enzima denominada ceruloplasmina proteína plasmática que contiene cobre y con actividad de ferroxidasa. Una vez en forma férrica, el hierro se incorpora a la transferrina, proteína que presenta dos sitios de unión para hierro férrico por molécula. La cantidad de hierro que se une a esta proteína va de 90 a 120 $\mu g/100$ ml de suero para el caso de la mujer y de 120 a 140 $\mu g/100$ ml para varones (1,20,21).

1.6. FUNCION DE ALGUNAS PROTEINAS QUE CONTIENEN HIERRO

1.6.1 Transferrina

La transferrina es una betaglobulina (antiguamente llamada siderofilina) que es capaz de ligar hierro, existiendo la posibilidad de combinarse con mucho menor afinidad con cobre, zinc y otros metales. Está formada por una sola cadena polipeptídica con 680 aminoácidos; contiene aproximadamente de 5 a 6% de carbohidratos y tiene un peso molecular que va de 66 a 95 Kd, según la especie. Cada molécula de transferrina presenta dos sitios de unión específicos para átomos de hierro en estado férrico, este complejo de hierro se disocia a un pH menor a 7.0 (Figura 2) (9,15,23).

La transferrina es una proteína sérica cuya concentración en el suero humano es de 200 a 400 mg/dl. Su síntesis se lleva a se lleva a cabo en diferentes órganos como hígado, nódulos linfáticos y leucocitos de sangre periférica, saco vitelino, glándulas mamarias y médula ósea. Los sitios de producción varían dependiendo de la especie y del estado de desarrollo del organismo (9,15,25).

Una de las funciones más importantes de la transferrina es la de transportar el hierro desde el sitio de su absorción hasta la médula ósea, en donde se incorpora principalmente al grupo hemo para la síntesis de hemoglobina. La molécula cargada con hierro, se une a receptores de la membrana de reticulocitos y se internaliza liberando al hierro. Posteriormente la transferrina sale de la célula regresa al torrente sanguíneo como apotransferrina ya libre de hierro. También puede transportar hierro en pequeñas cantidades al hígado y a otros tejidos para la incorporación a diversos sistemas enzimáticos que requieren de dicho ión metálico (1,9,15).

1.6.2 Ferritina

La ferritina es una proteína de una gran diversidad, se localiza, en los vertebrados, principalmente en tejidos como el hígado, bazo, intestino, médula ósea, músculo cardíaco, células tumorales y en cantidades pequeñas en el suero y/o plasma sanguíneo. También se le encuentra en hongos, plantas y bacterias (2,8).

La ferritina de los vertebrados es soluble en agua, presenta un alto peso molecular de 450 a 500 Kd y seis canales por donde penetra y se deposita el hierro. La molécula está compuesta de dos partes: una proteica denominada apoferritina (sin hierro) de forma esférica y hueca semejando a la cubierta de un virus, está formada por 24 subunidades y cada subunidad tiene un peso molecular que oscila entre 19 y 21 Kd. Dentro de esta esfera proteica se encuentra la otra parte de la ferritina, que consiste de una micela inorgánica de hidrofosfato férrico donde se almacena el hierro. Cada molécula de apoferritina puede contener de 2,500 a 5,000 átomos de hierro (Figura 2) (10,14).

Muchos de los estudios para determinar el sitio donde se lleva a cabo la síntesis de ferritina han sido efectuados en células hepáticas de diversos vertebrados. Drysdale y Munro (10) inyectaron hierro extraño a ratones para estimular la síntesis de apoferritina en las células del hígado. Observaron que la actividad específica de la ferritina se incrementa a su máximo. 5 horas después de suministrar el hierro; la actividad decrece después de este tiempo, pero la cantidad de ferritina en el hígado continúa incrementándose hasta 12 horas después. Esta inducción de la síntesis de ferritina mediante la inyección de hierro extraño ha sido confirmado por Bomford y Munro en otros tejidos de diferentes especies animales (10) Por otro lado Early y Granick observaron que la acumulación de ferritina en el hígado y otros tejidos, se debe a la síntesis de apoferritina cuya producción se estimula cuando hay un exceso de hierro en el organismo (14).

1.6.3 Hemosiderina

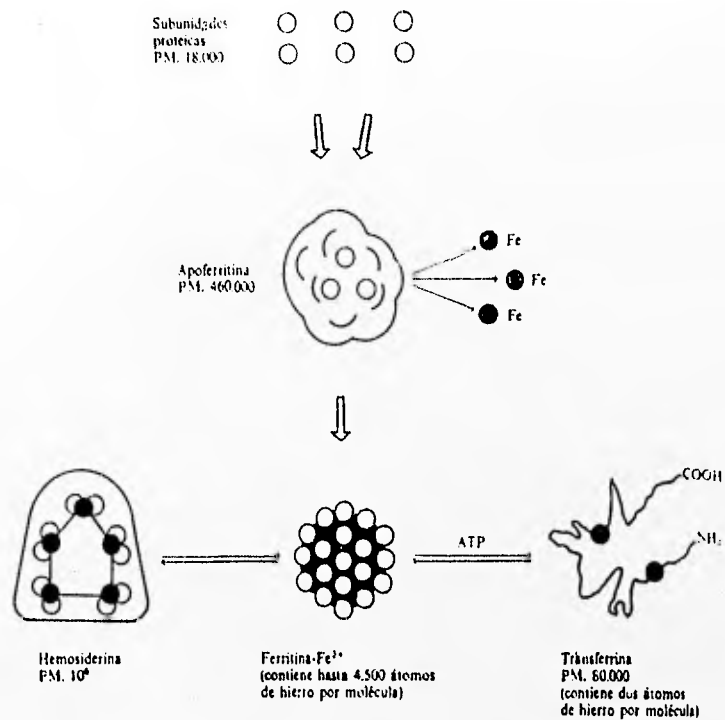
Este término es más viejo que el de ferritina y fue acuñado por primera vez en 1888 por Neumann (28) y se refiere a agrupaciones de hierro visible a través del microscopio óptico. Neumann los definió como granulos de color ocre por la presencia de hierro. Actualmente los histólogos definen a la hemosiderina como: depositos de granos muy finos o masas amorfas de color amarillo castaño. Con respecto a su origen algunos autores lo atribuyen a mezclas de ferritina y micelas ferruginosas con productos de digestión y autodigestión del metabolismo celular (28). La eliminación de los eritrocitos a través del sistema reticuloendotelial (destrucción extravascular), es el mecanismo más eficiente para eliminar células viejas y recuperar componentes esenciales como aminoácidos y hierro.

Conforme se va liberando el hierro es capturado por la transferrina plasmática que lo transporta a la médula ósea o a los hepatocitos donde se almacena en moléculas de ferritina. Al parecer cuando el hierro ha saturado la capacidad de la ferritina, el remanente se acumula principalmente en las células de Kupffer. Dentro de su citoplasma las moléculas de hierro se comprimen en agregados amorfos y voluminosos de material insoluble en agua ó hemosiderina, la se acumula en los hepatocitos. Los granos de hemosiderina contienen hasta 37% de su peso en hierro. Tanto la ferritina como la hemosiderina constituyen las dos formas principales de almacenamiento de hierro (Figura 2) (8,14).

2.0 LA ERITROPOYESIS

La eritropoyesis es un mecanismo presente en los vertebrados a través del cual se realizan la producción, diferenciación y maduración de nuevas células rojas para entrar en circulación y sustituir a las que envejecen. Los eritrocitos se producen en la médula ósea. Ya que la hemoglobina contiene hierro, para su

FIGURA 2



Se muestran las tres principales proteínas fijadoras de hierro. En primer término esta la apoferritina con sus subunidades, se observa el intercambio de hierro con la hemosiderina y con la transferrina.

Tornado de Herrera, E. (1986) Bioquímica. Nueva Editorial Interamericana México, D.F. 993-1029.

La síntesis requiere tanto hierro, como globina, además de cantidades muy pequeñas de otros nutrientes como cobre y manganeso. La vitamina C es necesaria debido a que facilita la absorción del hierro de los alimentos. Hay otras vitaminas como la B12, B6 y el ácido fólico que cuando llegan a faltar pueden propiciar algún tipo de anemia.

Los estudios sobre eritropoyesis se llevan a cabo en diferentes especies de vertebrados como son: conejo, rata, ratón, perro y humano, principalmente a nivel de médula ósea, el órgano hematopoyético por excelencia en los mamíferos en edad adulta. La médula ósea está constituida básicamente por dos elementos, el estroma medular y las células hematopoyéticas (17,29). Till y McCulloch, tras una serie de trabajos con médula ósea de ratón, observaron que cuando éstos son expuestos a una dosis letal de radiación ionizante, los órganos hematopoyéticos son inhibidos totalmente. Si esta operación va seguida de una inyección de células isogénicas de médula ósea normal, los ratones sobreviven y al cabo de ocho días se localizan nódulos independientes en el bazo. Cada uno de estos nódulos está constituido por varias clases de células hematopoyéticas, esto hizo pensar que cada colonia surgía de una sola célula. Así fue como se pensó en la existencia de un tipo celular pluripotente en la médula ósea, capaz de dar origen a diversas clases de células hematopoyéticas además de autoduplicarse a la que se llamó Unidad Formadora de Colonias del bazo (CFU-S) (24,29).

Las células madre hematopoyéticas deben cumplir dos funciones importantes:

- Diferenciarse en los elementos sanguíneos maduros y
- Autorenovarse para mantener la población de células madre.

Las células (CFU-S), dan origen a la denominada unidad expansiva de colonias eritroides (BFU-E), éstas a su vez son precursoras de la llamada Unidad Formadora de Colonias Eritroides (CFU-E). Las CFU-E aparentemente son las células precursoras de los eritrocitos, se les ha identificado morfológicamente, y han sido bien caracterizadas en humano y otros mamíferos (Figura 3). A continuación se describen los diferentes estadios de las células que anteceden a los eritrocitos. Estos estudios se han llevado a cabo en médula ósea de humano y en médula ósea de conejos por Mayani Viveros de nuestro laboratorio (17).

El primer estadio celular corresponde al pronormoblasto que es un precursor incapaz de autorenovarse. Se piensa que está en fase de programación para la diferenciación. Este posee un diámetro de aproximadamente 20μ , de forma irregularmente ovalado, el núcleo (teñido con el colorante de Wright), ocupa hasta un 80% del total de la célula, la cromatina es fina con gránulos pequeños con uno o más nucleolos. El citoplasma es marcadamente basófilo. En este estadio aún no se detectan moléculas de hemoglobina en el citoplasma, aunque hay reportes que indican la presencia de RNA mensajero como un evento preliminar a la biosíntesis de dicha

proteína (17). El pronormoblasto al dividirse por mitosis origina citoplasma, aunque hay reportes que indican la presencia de RNA mensajero como un evento preliminar a la biosíntesis de dicha proteína (17). El pronormoblasto al dividirse por mitosis origina al normoblasto basófilo, que es el segundo estadio del eritrocito en maduración, tiene un diámetro aproximado de 16 a 18 μ , el núcleo ocupa las tres cuartas partes del área total del citoplasma y presenta un color violeta rosáceo, la cromatina esta arreglada en granulos gruesos. Sigue el normoblasto policromatófilo con un diámetro de 12 a 15 μ , es aquí donde se inicia la síntesis de hemoglobina, la que se deposita en el citoplasma originando un color que va del azul claro al verde grisáceo, el núcleo ocupa casi la mitad del citoplasma y generalmente está ubicado fuera del centro de la célula, la cromatina se encuentra más condensada que en los estadios anteriores (30,31).

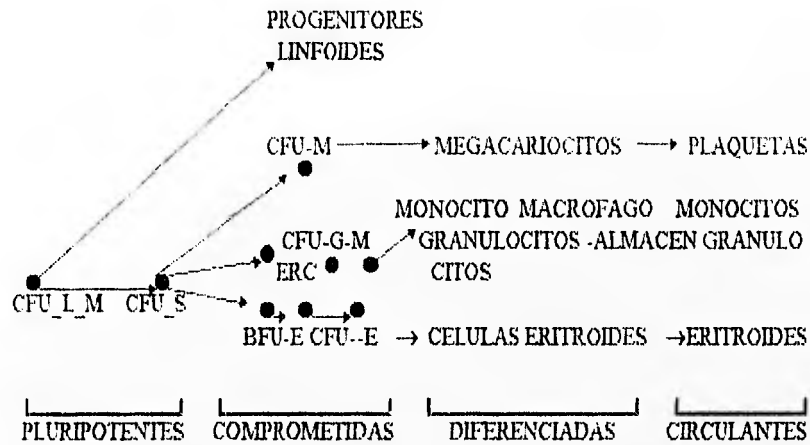
Después pasa a normoblasto ortocromático que es el producto de la última división mitótica, su diámetro es de 10 a 14 μ , el núcleo está bastante condensado y ocupa una cuarta parte del área total de la célula, se encuentra desplazado hacia uno de sus lados. En este estadio la célula efectúa movimientos ondulatorios posiblemente como un evento previo a la expulsión del núcleo. Es a partir de esta etapa que se origina el reticulocito el cual sale a circulación a través de los sinusoides de la médula ósea. El reticulocito, antecesor del eritrocito, presenta las siguientes características: un diámetro de 10 μ m, aún conserva mitocondrias, algunos restos de retículo endoplásmico, vestigios de aparato de Golgi y polirribosomas.

Durante los estadios anteriores de la diferenciación celular se lleva a cabo entre un 70 y 80 % del total de la síntesis de hemoglobina y el resto es sintetizado durante la etapa de reticulocito que tiene una duración aproximada de 48 horas (17,30). Paulatinamente el reticulocito se va deshaciendo de sus organelos, algunos son degradados otros son expulsados por exocitosis. Así se alcanza el estadio final del eritrocito carente ya de todos sus organelos y constituido intracelularmente de hemoglobina y algunas enzimas. Presenta un diámetro de 7 a 8 μ , un volumen de 80 μ^3 , y un promedio de vida de 120 días en humanos. Conforme va envejeciendo el eritrocito la superficie de su membrana sufre alteraciones que al pasar por órganos como el bazo, son reconocidas por los macrofagos que los fagocitan y destruyen (31).

3.0 ANEMIA POR DEFICIENCIA DE HIERRO

En 1889 Hayem (20) definió que la anemia se producía por falta de hierro, se caracterizaba por tener eritrocitos menores que los normales con una cantidad de hemoglobina menor que la habitual.

FIGURA 3



- CFU-S** Unidad Formadora de Colonias en el Bazo
- CFU-L-M** Unidad Formadora de Colonias Linfoides y Mieloides
- CFU-G-M** Unidad Formadora de Colonias Granulocíticas y Macrófagos
- CFU-M** Unidad Formadora de Colonias Megacariocíticas
- ERC** Compartimiento Celular Sensible a Eritropoyetina
- BFU-E** Unidad Expansiva de Colonias Eritroides
- CFU-E** Unidad Formadora de Colonias Eritroides

Esquema de la Hematopoyesis

Tomado de Mayani-Viveros, H. J. (1984) Estudio y Caracterización de los Precursores Eritroides Presentes en la Médula Ósea de los Conejos a lo Largo de un Proceso de Anemia Inducida Experimentalmente. Tesis de Licenciatura, Fac. de Ciencias, UNAM.

Actualmente se le define como falta de sangre. Los vertebrados que sufren de anemia, cualquiera que sea su origen, no pueden suministrar el suficiente oxígeno a sus tejidos, aun cuando puedan compensarlo, hasta cierto punto con un aumento en el flujo sanguíneo (20,32). La pérdida crónica de sangre es la causa más frecuente de anemia. Una hemorragia de este tipo casi siempre origina deficiencia de hierro y si es intensa dará origen a una anemia microcítica hipocrómica que va acompañada de una eritropoyesis normoblástica en la médula ósea. En la actualidad existen varios factores que explican la deficiencia de hierro. Una dieta inadecuada raramente es la única causa de falta de hierro, excepto en la primera infancia, sin embargo una absorción inadecuada puede ser factor contribuyente e importante en algunas circunstancias sobre todo durante el crecimiento de los niños y durante el embarazo. La anemia en la primera y segunda infancia puede ocurrir por la falta de hierro en la dieta, la cantidad de hierro ingerido puede ser insuficiente para permitir el aumento del volumen sanguíneo que conlleva el crecimiento normal del niño. El estado de las reservas de hierro materno influye poco sobre el desarrollo de la anemia del feto ya que este puede obtener el hierro necesario, entre 80 mg/kg, aún cuando la madre sea deficiente en dicho metal (20,32). La anemia que se observa casi exclusivamente en niños, se puede explicar por una incorporación insuficiente de hierro, que le disminuye sus requerimientos y le propicia un inadecuado desarrollo. El embarazo es causa común de anemia por carencia de hierro. En las madres su frecuencia varía en diversas partes del mundo, se calcula que probablemente sea de un 25 % incluso en zonas donde los problemas nutricionales no son frecuentes.

La deficiencia de hierro puede tener varias causas, por ejemplo, el estado de las reservas de hierro de la madre al comenzar el embarazo guarda una relación con el número de embarazos previos y la presencia de diversas enfermedades, en particular las asociadas con la pérdida de sangre. Otra causa frecuente de anemia por deficiencia de hierro, en ambos sexos, es el sangrado crónico. En varones adultos la anemia por falta de hierro casi siempre resulta por la pérdida crónica a nivel de tubo digestivo como la debida a úlcera esofágica, gástrica o duodenal; lesiones malignas o benignas de estómago, intestino delgado, colon o hemorroides. Ingestión diaria de aspirinas puede ocasionar sangrado oculto por tubo digestivo. La pérdida de sangre, asimismo la infestación de helmintos es también causa importante de la deficiencia de hierro en varias partes del mundo. La hemólisis intravascular va seguida de una pérdida de hierro en la forma de hemosiderina en orina ocasionando deficiencia de hierro y anemia cuando se prolonga por mucho tiempo. Otra causa de deficiencia de hierro es una alteración en la absorción del mismo (20).

Aunque no se ha observado que en el hombre adulto se produzca anemia por una deficiencia de cobre, en cerdos se produce una anemia similar a la causada por falta de hierro. Se sabe que el 90% del cobre del plasma está unido a la globulina α_2 ceruloplasmina. El cobre interviene en la absorción, movilización y utilización de hierro para la síntesis de la hemoglobina, y para la formación y conservación de los citocromos respiratorios. También puede ejercer cierta acción sobre la hematopoyesis modificando la función de las enzimas respiratorias (18,20).

Poco se sabe del cobalto pero parece desempeñar cierto papel en la nutrición. Cuando se ha administrado cobalto en el hombre y en los animales se ha observado la estimulación de la eritropoyesis, pero no se sabe con certeza en que forma el cobalto aumenta la producción de glóbulos rojos (18,20).

La vitamina C también conocida como ácido ascórbico, se ha encontrado en diversos tejidos de plantas y animales superiores. La mayoría de estos organismos sintetizan ácido ascórbico a partir de glucosa y otros precursores sencillos. Se han descrito diversas funciones biológicas para esta molécula. Una de ellas es su participación en la reducción del hierro férrico a ferroso, lo que sucede en el lumen del intestino. Dicha reducción es necesaria para que el hierro pueda ser absorbido por el organismo y transportado a los sitios de almacenamiento para su posterior distribución a los órganos que los requieran (13,20).

Alrededor del año 1926 Minot y Murphy (20) descubrieron que el hígado curaba la anemia perniciosa, cuando éste se ingería en estado fresco. La búsqueda del principio activo del extracto de hígado culminó con el descubrimiento de la vitamina B12 por Smith, Rickes y colaboradores allá por 1948, y en 1956 fue establecida su estructura química por Hodgkin empleando cristalografía de rayos X; veinte años después fue sintetizada.

Esta molécula recibe varios nombres: factor antianemia perniciosa, factor proteico animal, factor extrínseco y zooferina. Esta vitamina es una molécula esencial para todas las células y que su deficiencia llega a producir un retraso en el crecimiento. La vitamina B12 y los derivados del ácido fólico son requeridos en el metabolismo de los ácidos nucleicos (20).

II. ANTECEDENTES GENERALES

En el laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias se ha desarrollado un modelo experimental *in vivo* para producir anemia crónica en conejos Nueva Zelanda blancos criados en el bioterio de la Facultad. Este modelo muestra que los mecanismos de incorporación de hierro a partir de la dieta y de formación de la sangre son muy rápidos, ya que le permiten al conejo reemplazar hasta un 20 % del volumen sanguíneo total extraído diariamente mediante punción intracardiaca. Por otra parte es capaz de obtener de la dieta, sin recibir una dosis extra de hierro, hasta 10 mg de este ión metálico diariamente reponiendo así lo que pierde a través del sangrado (36).

Hemos demostrado que esta movilización acelerada del hierro se lleva a cabo sin alterar mayormente los mecanismos normales presentes en la sangre para el transporte de este elemento. Los niveles de transferrina presentes en el suero se incrementan ligeramente (alrededor de un 50 %) en los animales sujetos a una anemia crónica por sangrado y la saturación con hierro de la transferrina se eleva entre 50% y 80 % bajo estas condiciones experimentales respecto a la transferrina de animales controles.

El hierro se almacena en condiciones normales, en diversos órganos del cuerpo principalmente en el hígado en forma de hemosiderina y ferritina. Pensamos que este hierro constituye una reserva importante que puede ser utilizada rápidamente en caso de urgencia, que es un hierro en estado altamente dinámico. El trabajo de esta tesis, es una extensión de los experimentos anteriores. Con él se pretende contestar una serie de preguntas relativas al transporte del hierro. Se emplea el modelo de anemia crónica inducida en conejos, donde sabemos que el transporte de hierro está incrementado, para conocer el posible papel que dentro de este fenómeno juegan las reservas de hierro. Así, en un inicio, ante la demanda acelerada de hierro inducida por el sangrado experimental, es necesario saber si el organismo dispone en primera instancia, de estas reservas, en tanto los mecanismos de absorción de hierro a partir de la dieta se incrementan si las reservas de hierro se utilizan hasta agotarse y es entonces cuando se incrementan los mecanismos de toma de hierro a partir de la dieta o si las reservas de hierro juegan más bien un papel pasivo y no se modifican ante el estímulo de la anemia.

Se conoce que el hígado es el principal órgano que almacena hierro, pero queremos conocer la cinética de este ión metálico en dicho órgano durante el periodo de anemia crónica mediante un sangrado diario. A través de este sangrado estamos provocando varias cosas: a) remover el hierro del animal a través de la extracción de las células rojas; b) desequilibrar el proceso de la eritropoyesis, esto es, que al extraer sangre diariamente se

estímule a la médula ósea a acelerar la producción de nuevas células rojas en sustitución de las removidas, y c) provocar que el sistema eritropoyético del conejo remueva hierro de su almacén principal (34). Para conocer y entender parcialmente el metabolismo del hierro en estos animales, evaluamos el contenido de este elemento en el hígado de los conejos experimentales y testigos; esto nos permitirá conocer qué tanto hierro es removido de la reserva principal durante el periodo de sangrado.

III. O B J E T I V O

El propósito del presente trabajo fue el de:

- examinar el comportamiento general de las reservas de hierro presentes en conejos sujetos a una anemia crónica experimental

- evaluar los parámetros hematológicos y comparar con datos obtenidos con anterioridad en este laboratorio.

- extraer el hígado de los conejos en días preestablecidos y evaluar el contenido de hierro en cada uno de ellos mediante una técnica colorimétrica.

IV. MATERIALES Y METODOS

Para estos experimentos se utilizaron conejos Nueva Zelanda albinos, de ambos sexos, con una edad promedio de nueve meses (Tabla 1) y un peso de 3 a 4 kg (Tabla 2). Todos los conejos fueron criados en el bioterio de la Facultad de Ciencias, UNAM, alimentados *ad libitum* con una dieta de Conejina (Purina S.A. de C.V.) y agua de la llave (17).

4.1 INDUCCION DE LA ANEMIA

Se formaron 8 grupos, (0,2,4,6,8,10,12, y 14) con 4 conejos en cada uno de ellos para provocarles la anemia. Todos los conejos se pesaron antes de someterlos al sangrado; se les extrajo diariamente un volumen constante de 10 ml de sangre/ kg de peso, por punción cardiaca, durante 15 días. Se emplearon jeringas de vidrio de 30 y 50 ml, y agujas del número 19, libres de pirógenos, ambas se enjuagaron con NaCl 0.9% p/v. La sangre que se colectó se depositó en matraces Erlenmeyer de vidrio de 125 ml con perlas de vidrio. Una alícuota de cada muestra se depositó en tubos con ácido etilendiamino tetracético (EDTA) al 20 % p/v en NaCl 0.9 % p/v, pH 7.4; esta solución evita que la sangre se coagule. Las alícuotas se utilizaron para medir los parámetros hematológicos como: número de células rojas (NCR), hematocrito (Htc), volumen corpuscular medio (VCM) y hemoglobina (Hb) (36).

4.2 MEDICION DE PARAMETROS HEMATOLOGICOS

Tanto el número de células rojas ($\times 10^6/\text{mm}^3$), el hematocrito (%) como el volumen corpuscular medio (μ^3), se midieron directamente con un contador de células Coulter Counter Modelo ZF, con equipo accesorio MHR Computer, Hemoglobinometer y Diluter. Se hace una dilución 1:50,000 de sangre total, (ISOTON II, solución electrolítica balanceada, Coulter de México, S.A. de C.V.) a partir de esta dilución se cuentan las células rojas, los valores de hematocrito y del volumen corpuscular se obtienen de esta misma dilución. Para la determinación de hemoglobina se efectúa una dilución 1:500 de la sangre total, se agregan de 3 a 5 gotas de hemolizante (ZAP-OGLOBIN II, reactivo para diagnóstico Clínico, Estromalizante para la determinación de hemoglobina, Coulter de México, S.A. de C.V.) a la dilución para que las células rojas se lisen y quede libre en el medio toda la hemoglobina para ser leída con el hemoglobinómetro (Coulter Electronics Inc.) que es un espectrofotómetro calibrado a 540 nm. La concentración de hemoglobina se expresa en gr/100 ml (17,31).

TABLA 1. Edad de cada uno de los conejos que se emplearon para este experimento

DIA DE AMENIA	NUMERO DEL CONEJO	SEXO	EDAD (MESES)	EDAD PROMEDIO POR GRUPO EXPERIMENTAL X = (MESES) D.S.
0	10.3	M	12	9.5 ± 3.69
	20.2	M	4	
	40.1	H	11	
	42.2	H	11	
2	42.2	M	8	12.0 ± 5.83
	44.3	M	6	
	64.1	M	17	
4	64.2	M	17	9.6 ± 2.88
	12.7	M	13	
	42.1	M	8	
6	43.4	M	8	8.5 ± 0.70
	41.4	H	9	
8	43.2	M	8	10.3 ± 5.85
	6.8	M	17	
	16.3	M	8	
10	44.1	H	6	9.0 ± 0.0
	41.1	M	9	
12	41.3	H	9	12.6 ± 1.52
	12.8	M	13	
	12.9	M	14	
14	43.1	H	11	9.5 ± 7.77
	12.3	M	15	
	20.6	H	4	

X = promedio D.S. = desviación estandar M= Macho H= Hembras

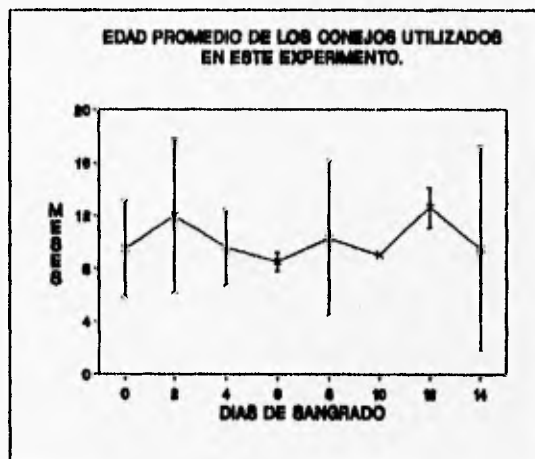
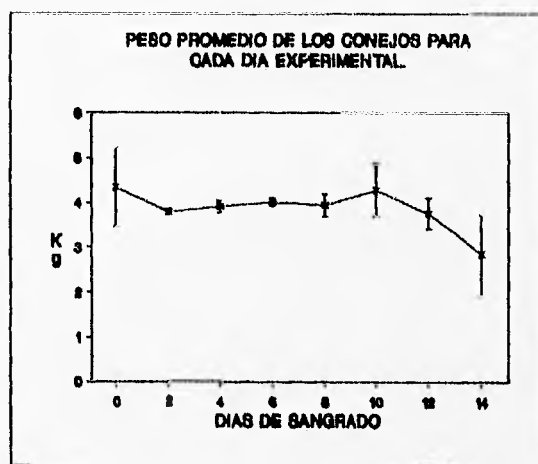


TABLA 2 Peso de cada uno de los conejos que se emplearon para este experimento.

DIA DE ANEMIA	NUMERO DEL CONEJO	PESO (Kg)	PROMEDIO DEL PESO EN CADA GRUPO EXPERIMENTAL.	
			\bar{x} (Kg)	D.S.
0	10.3	3.925	4.341 ± 00.89	
	20.2	3.290		
	40.1	5.200		
	40.2	4.950		
2	42.2	3.755	3.796 ± 00.14	
	41.3	3.845		
	64.1	3.960		
	64.2	3.625		
4	12.7	3.750	3.908 ± 00.13	
	42.1	4.000		
	43.4	3.975		
6	41.4	4.080	4.015 ± 00.09	
	43.2	3.950		
8	6.8	3.980	3.935 ± 00.25	
	16.3	4.160		
	41.1	3.665		
10	41.1	3.850	4.272 ± 00.59	
	41.3	4.695		
12	12.8	3.695	3.753 ± 00.34	
	12.9	3.440		
	43.1	4.125		
14	12.3	3.475	2.837 ± 00.90	
	20.6	2.200		

\bar{x} =promedio ; D.S.=desviación estandar



4.3 OBTENCION DEL HIGADO

En el último día de sangrado para cada grupo experimental se pesaron los conejos nuevamente y procedió a sacrificarlos por desnucación. Se disecta al animal a nivel del abdomen y se deja al descubierto la cavidad abdominal, se localiza el hígado, se extirpa y lava con NaCl 0.9% p/v para eliminar el exceso de sangre, se pesa y almacena en congelación a - 20°C (36).

4.4 DETERMINACION DE HIERRO EN HIGADO

4.4.1 Procesamiento del hígado

La técnica consiste en la remoción del hierro unido a proteínas siderófilas, principalmente el ligado a ferritina, hemosiderina y transferrina, esto ocurre a través de un cambio drástico en el pH del digerido con TCA y HCl, posteriormente hacer la determinación de hierro por colorimetría (35,39).

Con objeto de eliminar cualquier contaminante de hierro toda la cristalería empleada para las determinaciones se lava previamente con ácido nítrico a una concentración 6N, ácido clorhídrico concentrado o se hierve en una solución de Extrán libre de fosfatos (Merck) al 5% durante una hora. Después se elimina el exceso de ácido y jabón con agua corriente y finalmente se enjuaga con agua desionizada (35,39).

El hígado previamente descongelado, se homogeniza en un volumen de agua desionizada, cuatro veces el peso de hígado (p/v) en un homogenizador Polytron (Brinkman Instruments). Después de homogeneizar se mide el volumen total del mismo.

Se toman 5 ml del homogenado, se colocan en tubos de ensaye y se llevan a un volumen final de 30 ml con una mezcla de los siguientes ácidos: ácido tricloroacético (TCA), y ácido clorhídrico (HCl) en una concentración final de 1.53 M para el TCA y de 2.5 N para el HCl, cada tubo se hace por duplicado (37,38).

Los tubos se cubren con Parafilm, se agitan con un Vortex y se incuban en baño María a 65°C durante 24 horas para hidrolizar el tejido y se permita que el hierro quede libre en la fase acuosa, (36,37,38).

4.4.2 Análisis del hierro en hígado

Al término de las 24 hr de incubación se retiran los tubos del baño María y se colecta el sobrenadante en frascos libres de hierro. La evaluación de hierro en hígado de conejos se hizo espectrofotométricamente, empleando una modificación del método de Shade (39) preparado por Merck de México (Merckotest para hierro).

De cada sobrenadante se toma una alícuota de 1 ml se deposita en un tubo de ensayo y se lleva a un volumen de 5 ml con agua desionizada. De esta dilución se toma 1 ml para hacer la determinación del hierro libre en la solución, se reduce con ascorbato de sodio. Ya reducido se le hace reaccionar con batofenantrolina a un pH de 5.5 aproximadamente, para lo cual se adiciona al sobrenadante acetato de sodio al 30 % y se determina la absorbancia a 535 nm que corresponde al máximo de absorción del compuesto colorido. El cálculo de hierro se hace en función del cambio de coloración con respecto a la coloración de una solución patrón de hierro cuya concentración es de 1 $\mu\text{g/ml}$ de Fe (esta mezcla se agita para disolver totalmente el ascorbato, se añade 0.5 ml del reactivo de coloración). Las muestras se leen en un espectrofotómetro Carl Zeiss PMQ II, a 535 nm contra un blanco y un patrón preparados con el mismo procedimiento sustituyendo el hierro por agua o la solución patrón de hierro respectivamente (39).

Todas las soluciones aquí descritas, se preparan con agua desionizada en desmineralizador Corning LD2A.

4.5 Análisis Estadístico

Se utilizó la prueba de t de Student para muestras no pareadas considerándose una $p \leq 0.05$ como significativa. Se calculó la recta de regresión para las Figuras 9 y 10 y se consideró una $p \leq 0.05$ como significativa. Asimismo, se hizo un análisis de varianza de una vía para detectar diferencias entre las muestras estudiadas.

V. RESULTADOS Y DISCUSION

Los experimentos realizados se reportan en tres partes. En la primera se exponen aquellos resultados referentes a los parámetros hematológicos durante la anemia crónica inducida, con la finalidad de comparar los datos con el comportamiento clásico ya reportado por nuestro grupo (33,36). En la segunda se exponen los resultados referentes a la cantidad de hierro presente en el hígado, en los diferentes días de la anemia, para de ahí extraer posteriormente las conclusiones relativas al comportamiento de las reservas de hierro durante el transcurso de ésta. Finalmente en la tercera parte se presentan diferentes datos con el propósito de mostrar que las variaciones encontradas en los depósitos de hierro de los diversos conejos, son más bien producto del proceso de anemia, que el reflejo de una variabilidad individual independiente a dicho proceso. Esta última parte es necesaria, ya que por un lado efectivamente la variabilidad individual en muchos parámetros, en este caso los almacenes de hierro, desafortunadamente es grande, y por otra parte la necesidad de contar en un momento dado con un gran número de animales a sacrificar hizo que no siempre se pudiera tener animales de la misma edad o peso como hubiera sido deseable.

Aquí también deseo aclarar que el hecho de que no es posible sacrificar un gran número de animales en un solo día, hizo que los experimentos para los diferentes días reportados, por lo general, no fueran simultáneos sino más bien consecutivos.

5.1 COMPORTAMIENTO DE LOS PARAMETROS HEMATOLOGICOS DURANTE EL PROCESO DE ANEMIA

En trabajos realizados con anterioridad en este laboratorio se ha podido observar que cuando se induce una anemia crónica por sangrado, al removerse diariamente un volumen constante de sangre en conejos, ocurren una serie de cambios dentro de la fisiopatología de estos animales (33,35).

Algunos de estos cambios que se registran a lo largo del experimento, los resumimos en las Figuras 4,5,6 y 7. En ellas se observa que en el día 0 (conejos normales) todos los valores hematológicos corresponden con los reportados por otros trabajos realizados en nuestro laboratorio, incluso son valores un poco más altos que los reportados por la literatura (41,42).

Se observa que a partir del día 1 de anemia hay un descenso bastante marcado en la hemoglobina, hematocrito y el número de células rojas (Figuras 4, 5 y 6). Con respecto al volumen corpuscular (Figura 7) éste valor se incrementa desde $60 \mu^3$ hasta alcanzar un valor de $109 \mu^3$.

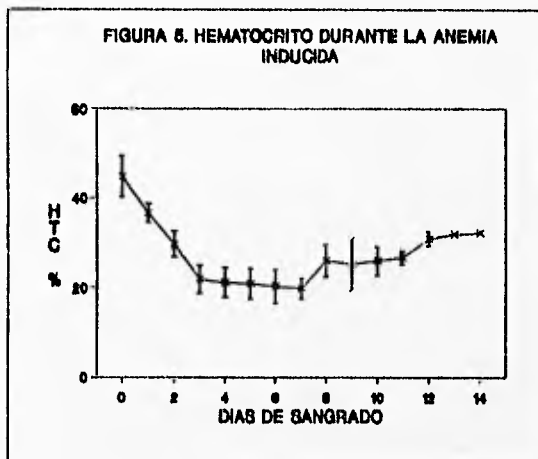
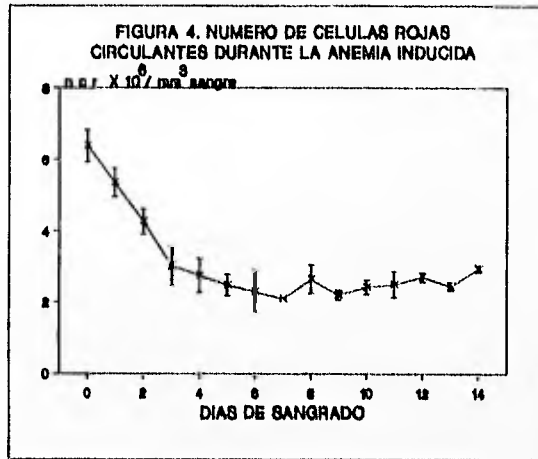


FIGURA 6. CONCENTRACION DE HEMOGLOBINA EN LA SANGRE DURANTE LA ANEMIA INDUCIDA

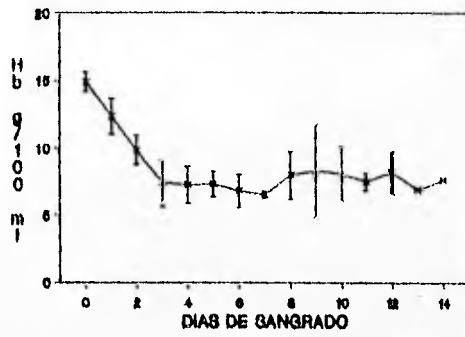
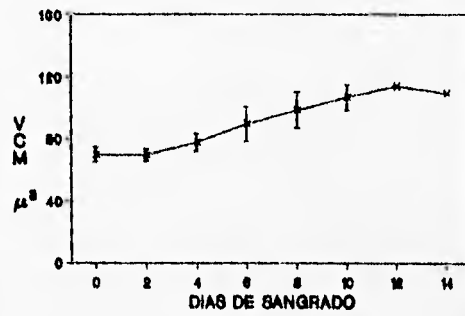


FIGURA 7. VOLUMEN CORPUSCULAR MEDIO DE LA CELULAS ROJAS CIRCULANTES DURANTE LA ANEMIA INDUCIDA



El comportamiento en el número de células rojas a lo largo del período de sangrado se muestra en la Figura 4. Del día 1 al 3 de anemia hay una notoria caída, del 3 al 7 se registra una baja menos drástica, registrándose un equilibrio a partir del día 7 hasta el final del experimento, sin llegar a alcanzar los valores iniciales.

El hematocrito es otro indicador de cómo se va desarrollando la anemia a lo largo del período de sangrado, se observa que el paquete celular va disminuyendo por la extracción diaria de sangre. Independientemente de que los conejos estén produciendo células nuevas, la médula ósea no alcanza a reponer el total de células que se están removiendo a diario y esto se refleja en el valor del hematocrito (Figura 5).

La hemoglobina es importante al igual que los anteriores parámetros pues nos muestra la cinética de esta proteína a lo largo de la anemia. En la Figura 6 se observan que al inicio del sangrado se produce una baja en la concentración de esta proteína, alcanzando un valor promedio de 7.0 g/100 ml en el día 3 del mismo. A partir de este día y hasta el final de los días de sangrado los valores de hemoglobina se mantienen constantes, sin llegar a alcanzar los valores iniciales.

Con respecto al volumen corpuscular medio, se registra un incremento en el volumen celular a lo largo de los días de la anemia, alcanzando valores hasta de aproximadamente $110 \mu^3$ (Figura 7).

Al relacionar los parámetros anteriores, pueden calcularse dos parámetros, el que nos indica la cantidad de hemoglobina por célula (MCH) y el que refleja la concentración corpuscular media de hemoglobina (MCHC). La población de células rojas en el equilibrio de la anemia crónica presenta un valor de MCH más alto, menor MCHC y mayor volumen, por lo que la anemia puede considerarse como macrocítica y ligeramente hipocrómica (33).

5.2 CONTENIDO DE HIERRO EN HIGADO

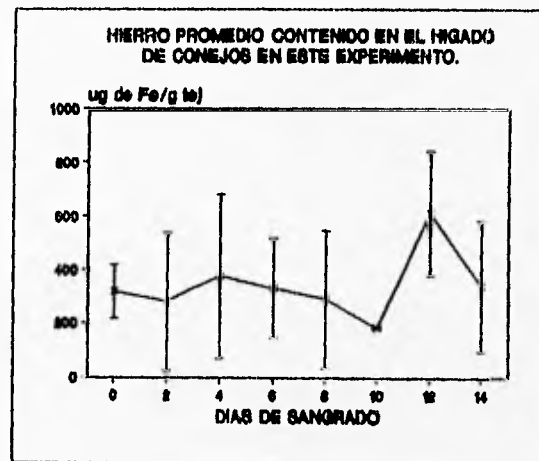
Los resultados del contenido de hierro en hígado de cada uno de los conejos de este experimento se muestran en la Tabla 3. Se observa un punto en el cual se registra una disminución en las reservas de hierro en el hígado que corresponde al día 10. También observamos un punto con valor alto de hierro en dicho órgano, que corresponde al día 12 de sangrado.

Se realizó la prueba estadística t de student no pareada para cada valor y el resultado se comparó con el valor promedio para el día cero, obteniéndose los siguientes resultados; para el día 10 de anemia la disminución no es significativa por lo que podemos afirmar que no hay una movilización de las reservas de hierro en hígado.

TABLA 3 Contenido del hierro en el hígado de los conejos, ($\mu\text{g Fe/g tejido}$)

DIA DE ANEMIA	NUMERO DEL CONEJO	$\mu\text{g Fe/g}$	VALOR PROMEDIO DE HIERRO POR GRUPO EXPERIMENTAL. ($\mu\text{g Fe/g}$) D.S.
0	10.3	448.57	316.77 \pm 100.08
	20.2	206.16	
	40.1	316.67	
	40.2	295.71	
2	42.2	72.32	280.21 \pm 256.58
	44.3	59.66	
	64.1	411.19	
	64.2	577.68	
4	12.7	725.93	374.73 \pm 306.66
	42.1	159.91	
	43.4	238.37	
6	41.4	459.93	329.79 \pm 184.03
	43.2	199.66	
8	6.8	214.05	290.42 \pm 255.56
	16.3	575.47	
	44.1	81.76	
10	41.1	181.17	182.75 \pm 2.24
	41.3	184.34	
12	12.8	342.41	608.96 \pm 231.36
	12.9	726.64	
	43.1	757.84	
14	12.3	509.98	338.34 \pm 242.72
	20.6	166.71	

X=promedio ; D.S.=desviación estandar



Para el valor promedio más alto de hierro en hígado, que corresponde al día 12 del sangrado (608.96 ± 231.36), el incremento de hierro en el hígado de conejos anémicos es real pues estadísticamente hay una diferencia significativa de este valor con respecto al obtenido para los conejos control ($p < 0.05$).

Desafortunadamente por la naturaleza de la metodología empleada, se debe extraer el hígado del animal para hacer un análisis total del hierro almacenado en él, con el consecuente sacrificio del conejo, por lo que las figuras que se presentan aquí, relativas al comportamiento de los parámetros hematológicos durante el transcurso de la anemia, son gráficas compuestas integradas por un número progresivamente menor de individuos con respecto al tiempo inicial del sangrado crónico. A pesar de ello, su comportamiento general es similar al anteriormente reportado para este proceso. Como las muestras se tomaron por duplicado, cada punto de las tablas referentes al hierro almacenado incluye cuando menos dos animales sacrificados. Dado que el equilibrio en la anemia crónica inducida se alcanza hasta el día 11 de sangrado, fue necesario obtener el hígado cada dos días (0,2,4,6,8,10,12 y 14) reduciéndose el número de conejos por grupo.

Como mencioné en el inicio de esta sección de resultados, a lo largo del proceso de anemia los principales parámetros hematológicos medidos fueron: el número de células rojas, hematocrito y cantidad de hemoglobina, cuyos datos están representados en las figuras 4,5 y 6 respectivamente. Estos datos, en todo semejante a los reportados anteriormente para el proceso de anemia inducida experimentalmente, nos sirven para monitorear dicho proceso. Como se puede observar en las figuras arriba mencionadas a partir del día 0 que representa el día inicial de sangrado y cuyos valores hematológicos representan los valores normales para el conejo, se inicia una fase de anemia aguda que culmina en el día 3 aproximadamente. Esta fase se caracteriza por la pronunciada disminución de los valores hematológicos experimentales día a día, que en total decrecen más de un 50 % de su valor inicial, debido a que en esta fase, el mecanismo compensatorio de formación incrementada de la sangre, apenas comienza a ponerse en marcha.

La siguiente etapa corresponde a la fase de recuperación que va aproximadamente del día 4 al 10; en ella, la formación incrementada de sangre funciona a su máxima capacidad, unas cuatro o cinco veces más que con el mecanismo habitual. En esta etapa se observa primero una disminución menor de los valores hematológicos seguida de un lento incremento en los mismos hasta llegar al día 11, que da lugar a la siguiente fase, o de equilibrio del sistema, misma que mantiene sus valores hematológicos indefinidamente a lo largo del experimento. Estos valores representan un equilibrio entre la cantidad de células rojas o hemoglobina removidas diariamente, con aquellas

cantidades producidas en el mismo tiempo. Esta última fase ha permitido a nuestro grupo calcular de una manera absoluta la producción máxima diaria tanto de células rojas como de hemoglobina por conejo. Dicho cálculo no se efectuó en este caso ya que era innecesario para mis propósitos.

La Figura 7 muestra que la anemia resultante es de tipo macrocítica, con un incremento del volumen celular de los eritrocitos que va desde los valores normales ($70 \mu^3$) hasta alcanzar un valor entre las 110 y 120 μ^3 . Estos datos corresponden también con los valores anteriormente reportados (33). Finalmente, la Tabla 4 nos indica la cantidad de hierro removido a lo largo del experimento, calculada a partir de la hemoglobina extraída día con día. Se da también el valor total para los 14 días, que corresponde a 154.68 mg de Fe.

La Tabla 3 nos presenta el contenido de hierro en el hígado de los conejos reportado como μg de Fe por gramo de tejido. Se puede observar que efectivamente existe una gran variabilidad entre los diferentes individuos, la que inclusive aumenta en los conejos sujetos al proceso de anemia. Sin embargo el promedio del contenido de hierro en el hígado en los diferentes días es constante a lo largo de la anemia con la excepción del día 10, en donde la baja es apreciable y en el día 12 se incrementa al doble.

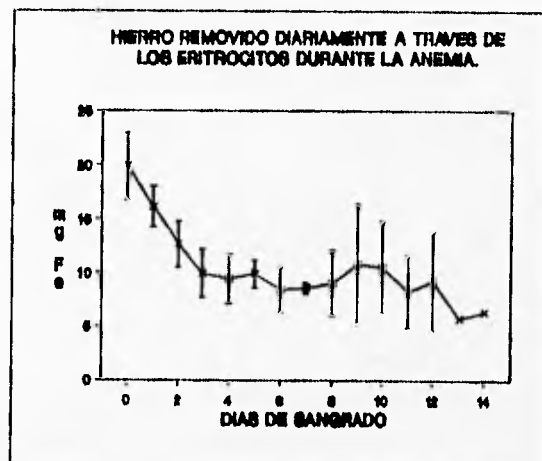
El cambio hacia la baja en el contenido de hierro del hígado en el día 10 del experimento puede interpretarse como una disminución marcada de las reservas del hierro debido a la súbita demanda de este elemento para el incremento en la formación de los glóbulos rojos.

Por otra parte, el incremento en las reservas para el día 12 se correlaciona bien con lo que sabemos que pasa con el hierro en circulación en los conejos anémicos, ya que en éstos el hierro sérico se incrementa aproximadamente al doble de sus niveles normales a partir del día 10 de sangrado, como puede observarse en la Figura 8 que no corresponde a datos obtenidos para la presente tesis, sino que es parte de experimentos previamente reportados por nuestro laboratorio (33).

La Tabla 5 muestra el peso de los hígados individuales extraídos a los conejos con dos finalidades: la primera, poder calcular el contenido total de hierro en el hígado de cada conejo (Tabla 6), ya que la Tabla 3 nos expresa este contenido pero por gramo de tejido; la segunda es observar como el peso promedio del hígado del conejo no varía sensiblemente a lo largo de la anemia experimental. Después de analizar los datos de la Tabla 5 estadísticamente, sólo aquellos hígados correspondientes al día 4 de sangrado resultan menos pesados que aquellos del resto del experimento.

TABLA 4 Valor promedio individual de la cantidad de hierro contenido en hemoglobina presente en las células rojas removidas diariamente durante la anemia inducida.

DIA DE ANEMIA	mg Fe / día
0	19.89
1	16.12
2	12.62
3	9.91
4	9.42
5	9.87
6	8.43
7	8.56
8	9.04
9	10.82
10	10.47
11	8.25
12	9.19
13	5.75
14	6.34
hierro total extraído durante los 14 días del sangrado.	→ 154.68



Los resultados de la Tabla 3 nos indican que el contenido de hierro depositado en el hígado es más inerte o menos dinámico de lo que se esperaba, ya que a pesar de los grandes requerimientos de hierro que existen, principalmente en la fase aguda de la anemia experimental, o sea, en los primeros días de ésta, el contenido de hierro depositado en el hígado prácticamente no varía a lo largo del sangrado.

Como ha sido mencionado arriba los datos de la Tabla 3 corresponden al contenido de hierro depositado en el hígado expresado como μg de hierro por gramo de tejido. No es la única manera de expresar estos resultados, hay maneras alternativas de hacerlo como se verá a continuación, pero posiblemente esta es la manera más directa de hacerlo. Otra manera de analizar estos datos es a través del contenido total de hierro presente en el hígado. Así, cuando se combinan los datos de la Tabla 3 con aquellos de la Tabla 5 relativos al peso total de cada uno de los hígados extraídos a los conejos, obtenemos los valores de la Tabla 6 que expresa dicho contenido total de hierro presente en el hígado. Como se muestra en la Tabla 5, el peso total de los hígados no varía significativamente entre los diferentes grupos promedio para cada uno de los días experimentales.

La precaución de valorar el contenido total de hierro en el hígado completo se tomó porque el hígado se expresó en la Tabla 3 como peso fresco y sabemos que cuando menos en el humano, hasta un 15 % de este peso puede corresponder a glucógeno almacenado en este órgano (13). Como en el presente experimento y debido a la naturaleza del mismo, no se sacrificó a los conejos después de 24 horas de ayuno para depletar al hígado de glucógeno, éste pudo haber estado presente en diferentes proporciones a lo largo de los distintos días de sangrado, por lo que el hierro expresado por gramo de tejido (Tabla 3) pudiera llevar a ésta ligera imprecisión.

Sin embargo, según se desprende del análisis de la Tabla 5, en donde, como anteriormente se mencionó, el peso promedio de los hígados no varía significativamente de día a día, se observa que el contenido de glucógeno no es un factor que contribuya a alterar los datos. La Tabla 6 presenta el valor absoluto en el contenido de hierro del hígado. Como se observa en ella, este valor promedio para cada grupo se mantiene constante a lo largo de los diferentes días de sangrado. Tanto la Tabla 3 como la 6 nos indican que aparentemente las reservas de hierro presentes en el hígado no se modifican con el proceso de inducción de la anemia, excepto para el día 12.

He mencionado que la variabilidad en el contenido individual de hierro en el hígado de los conejos es alta. Dado que los conejos sacrificados a lo largo de este experimento no eran uniformes en cuanto a sexo, peso y edad, quise analizar cada una de estas variables de manera individual para determinar si alguna de ellas tenía una influencia sobre el contenido de hierro en el hígado.

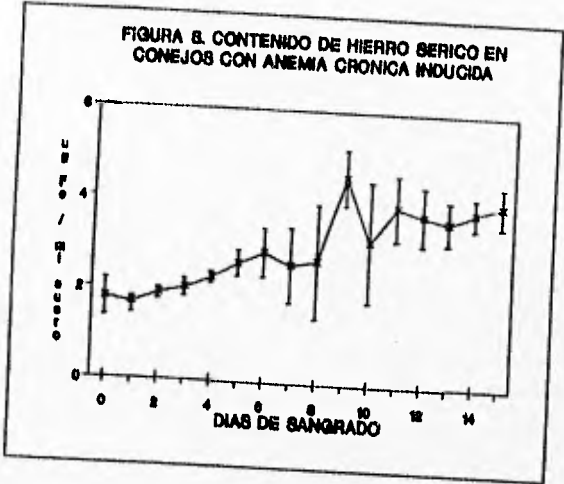


TABLA 5 Peso del hígado de cada uno de los conejos que se emplearon para este experimento

DIA DE ANEMIA	NUMERO DEL CONEJO	PESO (g)	PESO PROMEDIO DE LOS HIGADOS POR GRUPO EXPERIMENTAL	
			X=(g)	D.S.
0	10.3	100.5	107.30 ± 24.54	
	20.2	107.7		
	40.1	140.00		
	40.2	81.00		
2	42.2	97.00	97.00 ± 6.44	
	44.3	105.00		
	64.1	90.00		
	64.2	96.00		
4	12.7	80.00	82.00 ± 3.46	
	42.1	86.00		
	43.4	80.00		
6	41.4	101.00	103.00 ± 2.86	
	43.2	105.00		
8	6.8	110.00	102.00 ± 8.62	
	16.3	93.00		
	44.1	104.00		
10	41.1	103.00	109.50 ± 9.19	
	41.3	116.00		
12	12.8	105.00	98.33 ± 9.07	
	12.9	88.00		
	43.1	102.00		
14	12.3	95.00	92.5 ± 3.53	
	20.6	90.00		

X=promedio ; D.S.=desviación estandar

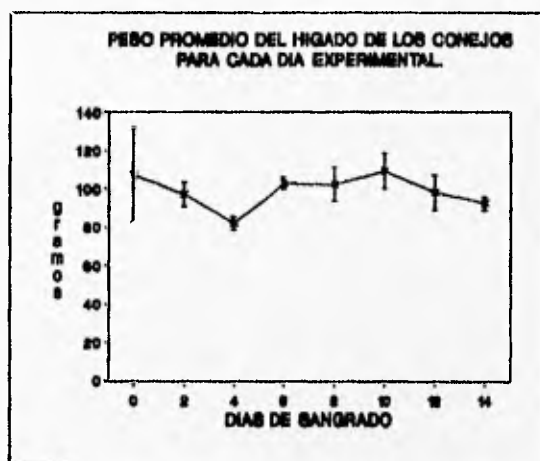
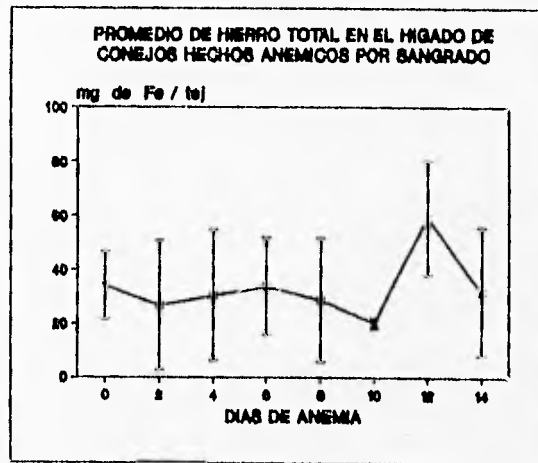


TABLA 6 Contenido de hierro total en hígado de cada conejo que se empleó para este experimento.

DIA DE ANEMIA	NUMERO DEL CONEJO	mg Fe TOTAL EN HIGADO	VALOR PROMEDIO DE HIERRO POR GRUPO EXPERIMENTAL	
			X= mg Fe TOTALES	D.S.
0	10.3	45.08	33.89 ± 12.51	
	20.2	22.20		
	40.1	44.33		
	40.2	23.95		
2	42.2	7.01	26.43 ± 24.06	
	44.3	6.26		
	64.1	37.00		
	64.2	55.45		
4	12.7	58.07	30.28 ± 24.20	
	42.1	13.75		
	43.4	19.06		
6	41.4	46.45	33.70 ± 18.02	
	43.2	20.96		
8	6.8	23.54	28.52 ± 22.91	
	16.3	53.51		
	44.1	8.50		
10	41.1	18.60	20.02 ± 1.92	
	41.3	21.38		
12	12.8	35.95	59.06 ± 21.10	
	12.9	63.94		
	43.1	77.29		
14	12.3	48.44	31.72 ± 23.64	
	20.6	15.00		

X= promedio ; D.S. = desviación estandar.



El primer parámetro analizado fue el sexo de los individuos. En trabajos anteriores en nuestro laboratorio se han utilizado indistintamente conejos machos o hembras como sujetos de la anemia experimental inducida pues se observó que no había diferencias significativas en los resultados en cuanto al sexo (47,48). En la Tabla 7 podemos apreciar el contenido promedio de hierro en el hígado de las hembras o machos ya sean controles o experimentales. Como se observa no hay diferencia significativa con respecto al sexo, ya sea que se trate de los animales controles o de los experimentales. Estos resultados corroboran lo que previamente se había observado en el laboratorio con respecto a los otros parámetros hematológicos, esto es, que no había en ellos una variación cuantitativa en relación con el sexo.

En relación con el peso de los conejos, la Figura 9 nos muestra que no existe correlación alguna entre peso corporal y el peso hepático de los conejos.

Por lo anterior ni la variación en sexo, ni aquella relativa al peso pueden explicar la variabilidad observada en cuanto al contenido de hierro hepático en los conejos. En cambio, existe una correlación altamente significativa desde el punto de vista estadístico ($p = 0.009$), entre el contenido de hierro hepático y la edad de los conejos como se observa en la Figura 10.

T A B L A 7

CONEJOS CONTROL	NUMERO DE CONEJOS	PROMEDIO DE HIERRO
		CONTENIDO EN HIGADO $\mu\text{g Fe/g tejido}$ X D.S
HEMBRAS	2	306.19 \pm 14.82
MACHOS	2	327.36 \pm 171.10
CONEJOS EXPERIMENTALES		
HEMBRAS	5	350.116 \pm 278.13
MACHOS	11	356.74 \pm 231.08

En esta tabla se separan y machos, en controles y experimentales, no se observa una diferencia significativa en el promedio de hierro en hígado dependiente del sexo. Denominamos controles a aquellos conejos que no habían sido sangrados en los días previos a su muerte (día), en comparación a los experimentales, a aquellos que llevaban un día o más de la anemia experimental en el momento de ser sacrificado.

Figura 9. Peso corporal contra peso hepático en conejos anémicos.

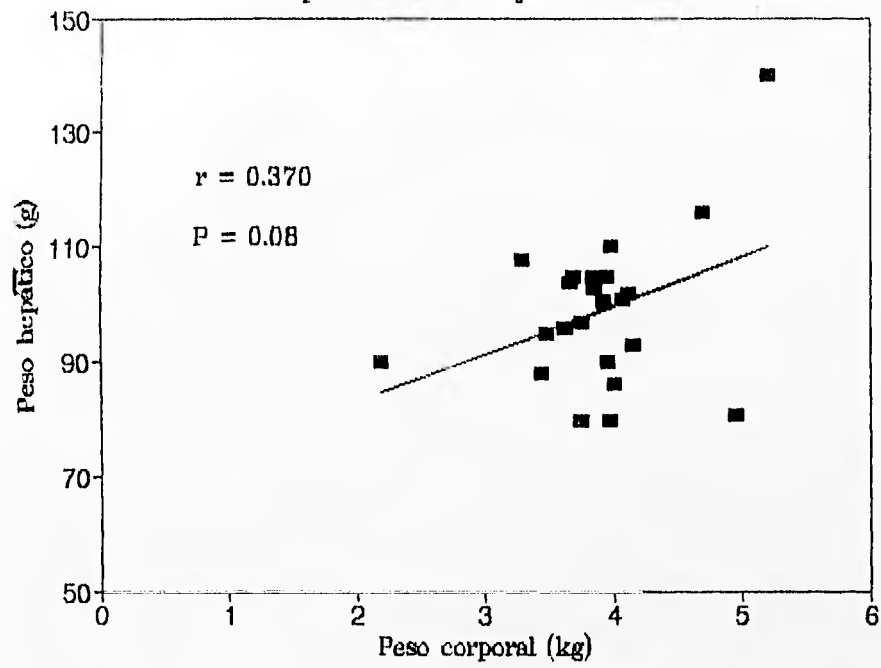


Figura 9. Peso corporal contra peso hepático en conejos anémicos.

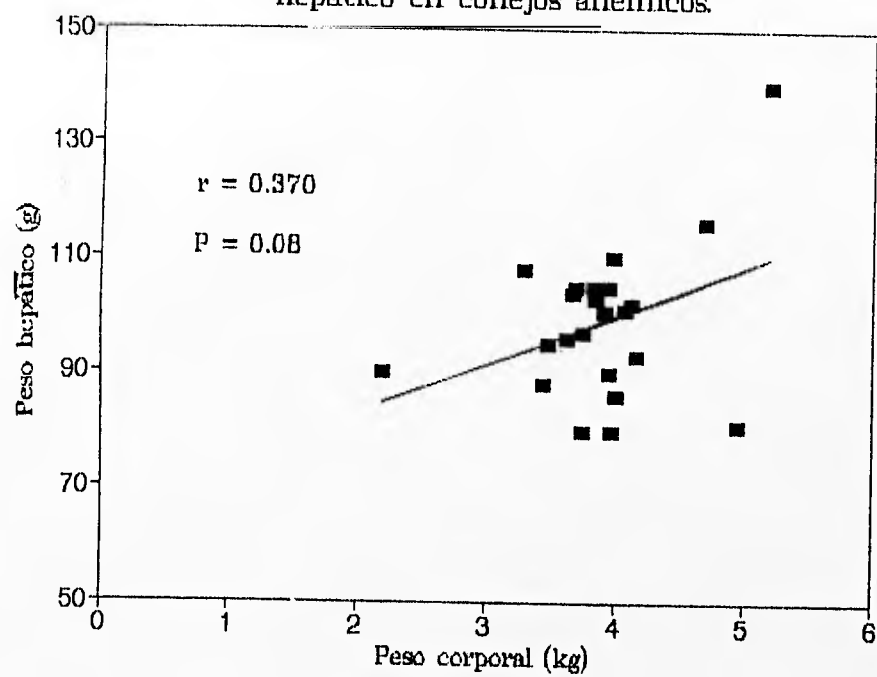
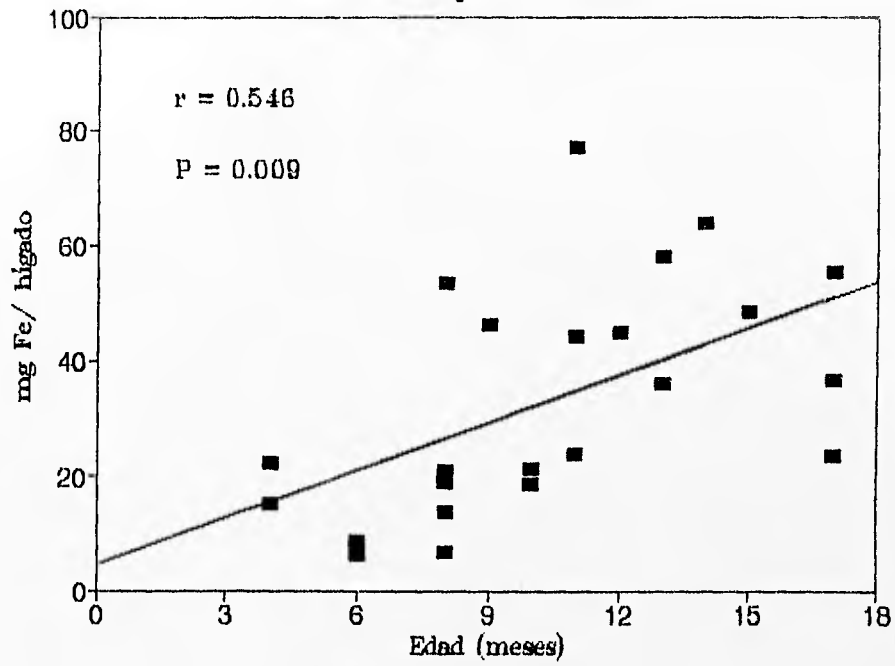


Figura 10. Hierro total contra edad en conejos anémicos.



VI. CONCLUSIONES

Con base a los resultados obtenidos en este trabajo, podría concluir:

1. Los valores de los parámetros hematológicos encontrados fueron similares a los ya reportados en trabajos anteriores de nuestro laboratorio. Ello confirma que el modelo de estudio *in vivo* que se emplea en este laboratorio para la anemia es altamente reproducible.
2. Por lo que respecta al contenido de hierro en el hígado de los conejos tanto experimentales como testigos puedo afirmar que no hubo una remoción real de hierro del hígado a lo largo de la anemia. Esto nos hace pensar que el conejo toma hierro de la dieta para incorporarlo a la síntesis de hemoglobina.
3. Se produce un aumento en el contenido de hierro del hígado en el día 12 de sangrado, que corresponde a la fase de equilibrio de la anemia.
4. Existe una relación directa entre la edad de los conejos y el contenido de hierro en el hígado, a diferencia del sexo en donde no se observó una diferencia significativa.

VII. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Crichton, R.R., Charlotiaux-Wauters, M. (1987) Iron transport and storage. *Eur J Biochem* 164:485-506.
- 2.- Theil, C.E. (1987) Ferritin: Structure, Gene Regulation and Cellular Function In Animals, Plants, and Microorganism. *Ann Rev Biochem* 56: 289-315.
- 3.- Worwood, M. (1977) The Clinical Biochemistry of Iron. *Seminars in Hematology* 14 (1): 3-30.
- 4.- Fisher, P., Bendor, A. (1972) Valor Nutritivo de los Alimentos Ed. Limusa-Wiley, S.A. México.
- 5.- Spiro, T. G., Saltman, P. (1974) Inorganic Chemistry en: *Iron Biochemistry and Medicine*. Academic Press. Jacobs, A. Worwood, M. Edts. pp 1-28.
- 6.- Weiz, B.P. (1978) La Ciencia de la Zoología. Ed. Omega. Barcelona, España.
- 7.- Stryer, L. (1981) Biochemistry. E.H. Freeman and Company Ed. New York. San Francisco.
- 8.- Harrison, M.P. et al. (1974) Ferritin and Haemosiderin: Structure and Function en: *Iron in Biochemistry and Medicine* Academic Press. Jacobs, A. Worwood, M. Edts. pp 73-114.
- 9.- Morgan, E.H. (1974) Transferrin and Transferrin Iron en: *Iron in Biochemistry and Medicine*. Academic Press. Jacobs, A. Worwood, M. Edts. pp 29-71.
- 10.- Jacobs, A. (1985) *Current Topics in Hematology* 5 :25-62.
- 11.- Ostoa, S.P.. (1985) Estudio Acerca de la Relación Existente entre el Acido 2,3-Difosfoglicerato (2,3-DPG) y la Hemoglobina. Tesis de Licenciatura, Fac. Ciencias. Biología, UNAM.
- 12.- Perutz, M.F., (1983) Species Adaptation in a Protein Molecule. *Molecular Biology and Evolution* 1 (1): 1-28.
- 13.- Herrera, E. (1985) Bioquímica. Nueva Editorial Interamericana México, D.F.
- 14.- Munro, H.N., Linder, M.C. (1978) Ferritin: Structure, Biosynthesis and Role in Iron Metabolism. *Physiological Reviews* 58 (2):317-396.

- 15.- Aisen, P., Brown, E.B. (1977) The Iron-binding Function of Transferrin in Iron Metabolism. *Seminars in Hematology* 14 (1): 31-53
- 16.- Hillman, R.S., and Finch, C.A., (1987) El eritrocito. El Manual Moderno, S.A.de C.V. México, D.F.
- 17.- Mayani-Viveros, H.J., (1984) Estudio y Caracterización de los Precusores Eritroides Presentes en la Medula Osea de Conejos a lo Largo de un Proceso de Anemia Inducido Experimentalmente. Tesis de Licenciatura, Fac. de Ciencias, UNAM.
- 18.- Harrison, P.M., and Hoare, R.J., (1980) Metals in Biochemistry. Chapman and Hall, New York, pp
- 19.- Boesken, W.H., et al. (1977) Human Myoglobin: Preparation, Quantitation and Standardization. *Res Exp Med* 171: 71-78.
- 20.- Leavel, B.S., Thorup Jr, O.A., (1978) Hematología Clínica. Editorial Interamericana, México.
- 21.- Martin, D.W., Rodwell, V.W. (1985) Bioquímica de Harper. Ed. El Manual Moderno. S.A.de C.V. México, D.F.
- 22.- Turnbull, A. (1974) Iron Absorption en: *Iron Biochemistry and Medicine*. Academic Press. Jacobs, A., Worwood, M., Edts, 369-403.
- 23.- Harris, J.W., Kellermeyer, R.W., (1972) The Red Cell. Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts.
- 24.- Vazquez-Laslop, N.C. (1984) Cambios en los Parámetros Hematológicos y Aspectos del Transporte de Hierro Durante las Primeras Etapas del Desarrollo Posnatal en el Conejo. Tesis de Licenciatura. Fac. de Ciencias, UNAM.
- 25.- Aisen, P., Listowsky, I., (1980) Iron Transport and Storage Proteins. *Ann Rev Biochem* 49: 357-397.
- 26.- Jacobs, A., Worwood, M., (1984) Assessment of iron stores. *Association of Clinical Pathologist. Broadsheet* 111.
- 27.- Fawcett, D.W., (1987) Tratado de Histología. Interamericana-Mc Graw-Hill, México.
- 28.- Bessis, M. (1973) *Living Blood Cells and Their Ultrastructure*. Springer-Verlag, New York.
- 29.- Jacobs, P., Finch, C.A., (1971) Iron for Erythropoiesis. *Blood* 37 (2): 220-230.

- 28.- Bessis, M. (1973) *Living Blood Cells and Their Ultrastructure*. Springer-Verlag, New York.
- 29.- Jacobs.P., Finch,C.A.. (1971) Iron for Erythropoiesis. *Blood* 37 (2): 220-230.
- 30.- Rifkind,R.A., et al. (1974) Erythropoiesis en: *The Red Blood Cell* Academic Press. Douglas Mac Surgenor, Edts. pp 51-89.
- 31.- Mayani,V.H..(1986) Estudios Sobre la Eritropoyesis en el Conejo Durante la Recuperación de una Anemia Crónica Inducida Experimentalmente. Tesis de Maestría. Fac. de Ciencias.UNAM.
- 32.- Jacobs.A. (1974) Erythropoiesis and Iron Deficiency Anaemia en: *Iron in Biochemistry and Medicine*. Academic Press. Jacobs, A. Worwood, M. Edts. 405-436.
- 33.- Valdes López, V. (1977) Estudios sobre la Dinámica de Formación de la Sangre en Conejos Hechos Anémicos por Sangrado. Tesis de Licenciatura Fac. de Ciencias UNAM.
- 34.- Torrance, J.D.,Bothwell, T.H. (1980) Tissue Iron Stores. *Methods in Haematology* 1: 90-115.
- 35.- Velazquez Ocampo, M.P. (1984) Estudios Sobre la Ceruloplasmina y su Posible Papel en el Metabolismo del Hierro de Conejos Hechos Anémicos por Sangrado. Tesis de Licenciatura Facultad de Ciencias, UNAM.
- 36.- Pulido Cejudo Gabriel. (1982) Estudio de los Mecanismos Involucrados en el Transporte de Hierro en Conejos Hechos Anémicos por Sangrado. Tesis de Licenciatura. Fac.de Ciencias, UNAM.
- 37.- Rodriguez, M.J., Huberman, A., (1974) Improved Method for the Determination of NoHEME Iron in Animal Tissues. *Rev Invest Clin (Mex)* 26: 169-173.
- 38.- Frey, W.G., Gardner.M.H., Pillsbury,J.a., (1986) Quantitative Measurement of Liver Iron by Needle Biopsy. *J Lab and Clin Med* 77 (1): 52-57.
- 39.- Shade, A.L., et al. (1954) Bound Iron and Unsaturated Iron-binding Capacity of Serum; Rapid and Reliable Quantitative Determination. *Proc Soc Exp Biol Med*.87: 443-448.
- 40.- Van de Bogart M. et al. (1967) Micromethods for the Quantitative Determination of Iron and Copper in Biological Material. *Analytical Biochemistry* 20: 323-334.
- 41.- Weisbroth,S.H. et al. (1974) *The Biology of the Laboratory Rabbit*. Academic Press. London. pp 1-496.

42.- Wintrobe, M.M., (1961) *Clinical Hematology*. Lea and Febiger. Philadelphia.

43.- Bancroft, H. (1960) *Introducción a la Bioestadística*. Ed. Universitaria de Buenos Aires.

44.- Spigel, M.R., (1978) *Probabilidad y Estadística*. MacGraw-Hill. México.

45.- Nogawa, Koji., et al. (1984) Iron Concentration in Liver and Kidney of Cadmium Exposed Human Subjects. *Toxicology Letters* 00: 209-212.

46.- Barry, M., Sherlock, S., (1971) Measurement of Liver-Iron Concentration in Needle-Biopsy. *The Lancet* 16: 100-103.

47.- Widdowson, E.M., et al. (1948) Sexual Differences in the Storage and Metabolism of Iron. *Biochem* 42:577-581.

48.- Linder, M.C., et al. (1973) Mechanism of Sex difference in Rat Tissue Iron Stores. *Biochimica et Biophysica Acta* 297:70-80.

VIII. ABREVIATURAS

cc	centímetros cúbicos
CFU-S	Unidad formadora de colonias en el bazo
EDTA	Acido etilendiamino tetra-acético
°C	grados centígrados
g	gramos
Hb	Hemoglobina
HNO ₃	ácido nítrico
Htc	Hematocrito
h	hora
M	Molar
ml	mililitros
mm ³	milímetros cúbicos
nm	nanómetros
N	normal
NCR	Número de células rojas
p/v	peso sobre volumen
TCA	ácido tricloracético
VCM	Volumen corpuscular medio
%	Porcentaje
μ ³	Micras cúbicas

Sol. de extran al 5% = Extran MA O3 exento de fosfatos, medio para limpiar utensilios de laboratorio, Merck de México.
Sol sal = cloruro de sodio al 0.9% (p/v)