



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS

**ESTUDIO DE LOS MECANISMOS INVOLUCRADOS EN EL
TRANSPORTE DE HIERRO EN CONEJOS HECHOS ANEMICOS
POR SANGRADO**

T E S I S

Que para obtener el grado de:

B I O L O G O

P r e s e n t a :

GABRIEL PULIDO CEJUDO

1982



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

INDICE

	Página
ABREVIATURAS	1
ANTECEDENTES	3
INTRODUCCION	5
Reguladores de los precursores de las células granulocíticas, monocito-macrófago y megacariocíticas.	8
Reguladores del compartimiento de células eritroides.	9
Importancia del hierro para los seres vivos.	14
Sistema encargado del transporte de hierro.	16
Objetivo.	22
MATERIALES Y METODO	24
Inducción de la anemia.	24
Colección y tratamiento de la sangre.	24
Hematocrito.	25
Hemoglobina.	25
Conteo de células rojas.	26
Conteo de reticulocitos.	26
Concentración de proteína total.	27
Concentración de transferrina.	29
Inmunodifusión radial.	30
Determinación de hierro sérico.	34
Determinación de hierro no hemínico en hígado y bazo.	37
RESULTADOS	39

Primer experimento. - Proliferación del tejido eritroide del conejo, como respuesta a una estimulación progresiva provocada por la remoción de diferentes volúmenes de sangre.	40
Segundo experimento. - Efecto del suministro exógeno de hierro sobre la producción de sangre, en un estado de anemia inducida por sangrado crónico en el conejo.	55
Tercer experimento. - Efecto del suministro de transferrina en la eritropoyesis y el metabolismo del hierro en conejos anémicos.	67
DISCUSION Y CONCLUSIONES	75
RESUMEN	89
BIBLIOGRAFIA	91

ABREVIATURAS

MIH	Microambiente inductivo hematopoyético.
CFU-S	Unidad formadora de colonias en el bazo.
CFUL-M	Unidad formadora de colonias linfoide-mieloides.
CFU-M	Unidad formadora de colonias mieloides.
CFU-C	Unidad formadora de colonias en cultivo.
CFU _e	Unidad formadora de colonias eritroides.
BFU _e	Unidad "explosiva" formadora de colonias eritroides.
ERC	Células eritropoyetina sensibles.
ESF	Factor estimulador eritropoyético.
REF	Factor renal eritropoyético.
CSF	Factor estimulador de colonias.
CIA	Actividad-inhibidora de colonias.
NRA	Actividad-liberador de neutrófilos.
BSA	Albúmina de suero de bovino.
mRNA	Acido ribonucleico (mensajero).
tRNA	Acido ribonucleico (transferencia).
rRNA	Acido robonucleico (ribosomal).
hnRNA	Acido robonucleico (heterogéneo-nuclear).
DNA	Acido desoxiribonucleico.
kg	Kilogramo.
gr	Gramo.
mg	Miligramo.

lt	Litro.
ml	Mililitro.
μ l	Microlitro.
p/v	Peso a volumen.
v/v	Volumen a volumen.
rpm	Revoluciones por minuto.
mm	Milímetro.
cm	Centímetro.
nm	Nanometro.
min	Minuto.
μ	Fuerza iónica.

ANTECEDENTES

La sangre es sin duda alguna, uno de los tejidos más interesantes en cuanto a su fisiología. Se encuentra formado tanto por elementos celulares como por una substancia intercelular que los circunda, el plasma sanguíneo. La plasticidad y diversidad de los distintos tipos celulares que la constituyen, así como el gran número de proteínas, lípidos y otros compuestos orgánicos que se encuentran contenidos en la misma, permiten al organismo llevar a cabo diversas funciones. Es a través de la sangre, que el organismo puede establecer una comunicación entre dos órganos distantes, al transportar metabolitos u hormonas específicos desde el sitio de su liberación y/o producción hasta el sitio en el que estos actúan; puede evitar a su vez, la invasión de agentes extraños al producir células especializadas para esta función. Por otra parte el tejido sanguíneo media el intercambio gaseoso de cada uno de los órganos que irriga, al transportar en los glóbulos rojos, la proteína encargada de dicha función, es decir, la hemoglobina.

Es tal la importancia de este tejido, que en general un mal funcionamiento del mismo, puede provocar diversas alteraciones en el organismo, tales como anemias, infecciones, patologías hereditarias, etc.

En el presente trabajo, nos ocuparemos de algunos aspectos relacionados con el desarrollo de las células rojas del tejido sanguíneo, durante un estado de anemia inducido experimentalmente. Para este propósito, se ha hecho uso de un modelo experimental, en el cual, al san-

grar crónicamente del corazón a un grupo de conejos, se provocan las siguientes alteraciones:

- a) La inducción de un estado de anemia, durante el cual se causa una mayor proliferación tanto de la población eritroide, así como de la de algunas otras poblaciones que constituyen el tejido hematopoyético.
- b) La probable inducción de un estado de hipoxia.
- c) La alteración de algunos de los componentes del plasma, entre los cuales se encuentran aquellos involucrados en el transporte del hierro al tejido eritroide.

Este último punto será desarrollado ampliamente, tratando de enfatizar la importancia del hierro en la proliferación de las células rojas.

INTRODUCCION

El tejido sanguíneo se encuentra constituido principalmente por plaquetas, macrófagos, granulocitos, células linfáticas y hematíes o células rojas. No obstante la diversidad de este complejo celular en cuanto a forma y función, existe un buen número de evidencias que sugieren un origen común a partir de una célula pluripotencial denominada célula troncal (Stem cell)⁽¹⁻²⁾. A este tipo celular que deriva de la médula ósea roja, se le ha denominado CFU-S (unidad formadora de colonias en el bazo), por colonizar el bazo de ratas singénicas letalmente irradiadas. Sin embargo hay quienes postulan un origen polifilético, al observar diferencias entre la manera de proliferar y madurar de las células linfoides - con respecto a las mieloides ⁽³⁾. En relación a este punto, quienes reafirman un origen monofilético, han demostrado, que un mismo marcador genético aparece tanto en células linfáticas como en mielocíticas, después de inducir por radiación dicho marcador en una población indiferenciada que se supone antecede a ambos tipos celulares ⁽⁴⁾. A este precursor común de las células linfo-mieloides, se le ha llamado CFU-L-M (unidad formadora de colonias linfo-mieloides).

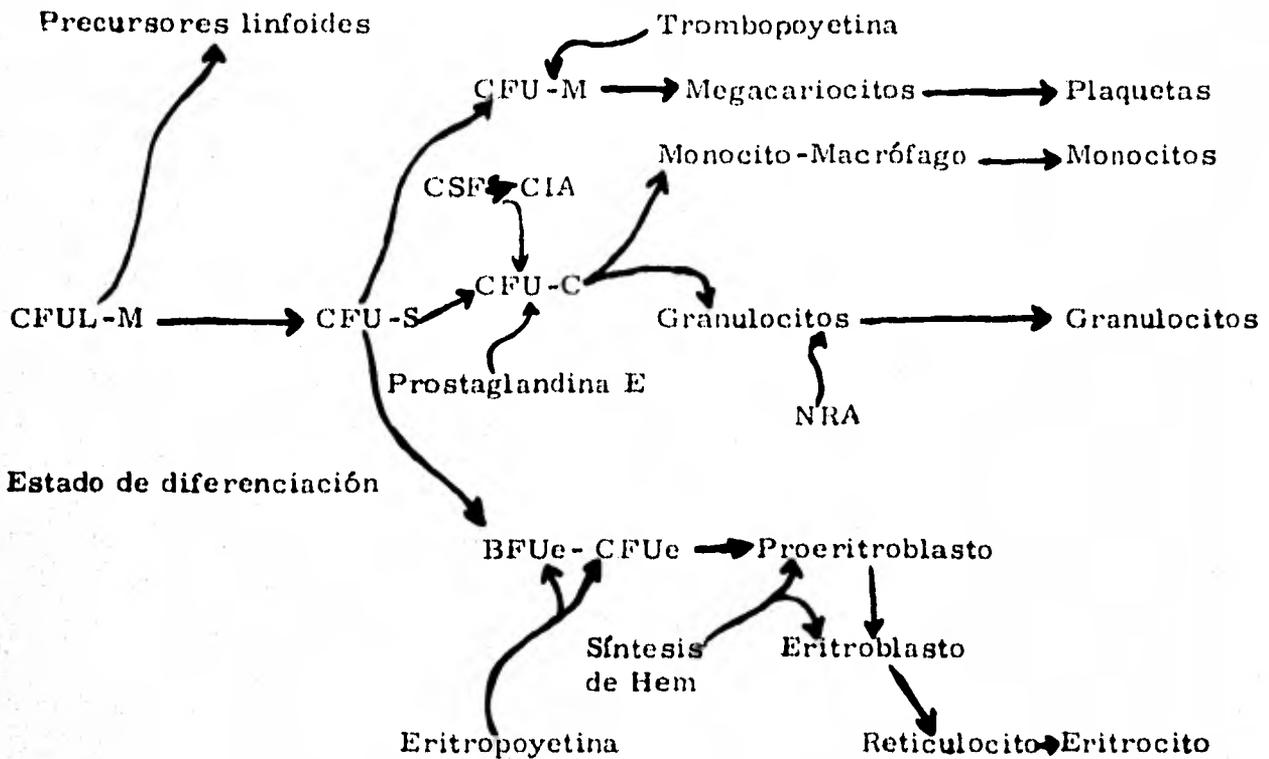
Cualquiera que sea el origen del tejido sanguíneo, las células indiferenciadas que al proliferar y madurar dan lugar a estirpes celulares con características propias, deben estar siendo influenciadas por ambientes específicos determinados por diversos factores, dándose lo que Trentin y Curry ⁽²⁾ denominan MIH (microambiente inductivo hematopoyético).

El precisar las condiciones que determinan los microambientes específicos para la proliferación de los componentes celulares del tejido hemático, constituye un problema toral dentro de los mecanismos que regulan el desarrollo de este sistema.

A continuación se describirá el origen del tejido sanguíneo de acuerdo con la teoría monofilética, a reserva de detallar después el papel que juegan ciertos factores humorales en la diferenciación celular.

La teoría monofilética plantea que existe un precursor común tanto para las células linfoides como para aquellas que constituyen el tejido mieloide, a la cual denominan, como ya se había aclarado con anterioridad, unidad formadora de colonias linfoide-mieloides (CFU-L-M). Esta colonia, por mecanismos aún desconocidos, derivaría hacia precursores linfoides, y por otra parte daría lugar a un nódulo clonal, denominado unidad formadora de colonias en el bazo. Esta a su vez, sería precursora de tres tipos de colonias diferentes: una primera colonia estaría comprometida con la producción de plaquetas (unidad formadora de megacariocitos CFU-M); una segunda denotada como CFU-C (unidad formadora de colonias en cultivo), sería el precursor tanto de granulocitos como de monocitos y la tercera, conocida como BFU-E (unidad "explosiva" formadora de unidades eritroides) daría lugar a los eritrocitos.

En la siguiente figura se esquematizan las relaciones antes descritas, ubicándose los factores involucrados en los procesos de maduración de cada uno de los precursores.



1º Estado de diferenciación

2º Estado de diferenciación Estado de maduración

Células Circulantes

Abreviaturas

CFUL-M	Unidad formadora de colonias linfoide-mieloides.
CFU-S	Unidad formadora de colonias en el bazo.
BFUe	Unidad "explosiva" formadora de unidades eritroides.
CFUe	Unidad formadora de colonias eritroides.
CSF	Factor estimulador de colonias.
CIA	Actividad-inhibidora de colonias.
NRA	Activador-liberador de neutrófilos.

Es importante destacar, que aunque se conoce poco acerca de los reguladores de la proliferación y maduración del tejido hematopoyético, podemos pensar que éstos deben estar actuando cuando menos a dos niveles:

- a) Induciendo un estado de proliferación y maduración, y
- b) Contrarrestando los efectos del sistema inductor.

De ésta manera el organismo produce en un momento dado, el número de células requeridas, de una forma controlada.

REGULADORES DE LOS PRECURSORES DE LAS CELULAS GRANULOCITICAS, MONOCITO-MACROFAGO Y MEGACARIOCITICAS.

Metcalf(7) ha descrito recientemente un par de factores proteicos involucrados en la proliferación tanto de granulocitos y macrófagos, - como de plaquetas. El primero de ellos, conocido como el Factor Estimulador de Colonias (CSF), activa in vitro la proliferación tanto de granulocitos como de monocitos⁽⁵⁾. Puede lograrse una elevación de esta glicoproteína al inducir la respuesta inmune humoral, por lo que se piensa que su producción esté mediada por células monocíticas⁽⁶⁾. El segundo factor, también glicoproteico, denominado trombopoyetina, puede inducir la maduración de los megacariocitos comprometidos en la formación de las plaquetas (7).

En cuanto a la proliferación de los precursores granulocíticos, Boggs⁽⁸⁾ y colaboradores demuestran la existencia de un compuesto llamado "Activador Liberador de Neutrófilos" (NRA) que, al ser liberado al plasma, induce la salida desde la médula ósea de neutrófilos maduros.

Con respecto a los factores que se postulan como inhibidores de la proliferación de los granulocitos y monocitos podemos citar dos: El primero es la prostaglandina E, liberada por los monocitos al detectar elevadas concentraciones de CSF⁽⁹⁾.

El segundo, conocido como Actividad-Inhibidora de Colonias (CIA) bloquea la liberación del CSF por los monocitos. Este último compuesto al parecer, es análogo a la lactoferrina⁽¹⁰⁾.

REGULADORES DEL COMPARTIMIENTO DE CELULAS ERITROIDES.

En 1906 fué descrito por Carnot y Deflandre, un factor humoral regulador del desarrollo de las células rojas⁽¹¹⁾. Estos autores demostraron que cantidades pequeñas de suero de conejos anémicos, inyectados a conejos normales, duplicaban el número de reticulocitos después de 3 días.

Bonsdorf y Jalavisto⁽¹²⁾, en 1948, denominaron a este factor humoral, Factor Estimulador Eritropoyético (ESF) o eritropoyetina. Desde entonces y debido al bajo rendimiento que se tiene durante su purificación, se ha hecho difícil su caracterización. No obstante se sabe que es una glicoproteína cuyo peso molecular no ha podido ser determinado con exactitud. Rosse et al⁽¹³⁾, calculan un peso molecular de 60,000 a 70,000 mientras que Goldwasser⁽¹⁴⁾, recientemente, le da un rango de peso molecular más amplio que va de los 27,000 a los 61,800 daltones.

En cuanto a los sitios de producción de la eritropoyetina, se han postulado al riñón y al hígado. Sin embargo, debido a la imposibilidad de purificar eritropoyetina a partir de extractos de riñón, se ha pensado

que este órgano no produce exactamente eritropoyetina, sino una enzima capaz de activar un precursor inactivo de esta hormona, el eritropoyetinógeno; dicha enzima se conoce con el nombre de Factor Renal Eritropoyético (REF) (15). El precisar el sitio, así como las condiciones que determinan la producción y/o liberación de la eritropoyetina, es en la actualidad, un aspecto importante y a la vez muy controvertido. Al parecer, la producción de eritropoyetina está acompañada de mecanismos muy precisos que regulan su actividad.

En este sentido, Kazal y Erslev (16), han demostrado que un factor lipídico, extraído de las fracciones microsomal, nuclear y mitocondrial de células renales, es capaz de inhibir la actividad de eritropoyetina de orina humana; sin embargo, en el mismo trabajo demuestran que cuando la eritropoyetina purificada de orina, es previamente incubada en suero normal, ésta es insensible al inhibidor. Este hecho indica que debe existir un factor sérico, que al unirse a la eritropoyetina, compita con el inhibidor lipídico, manteniendo la actividad de esta hormona; por otra parte, se ha visto que dicho factor se encuentra en mayor concentración en el suero de conejos expuestos a breves períodos de hipoxia.

A su vez, una serie de experimentos muestran que en condiciones de hipoxia o deficiencia en el consumo de oxígeno, se provoca un aumento sensible en los niveles de eritropoyetina sérica (17, 18).

Fisher et al (17), al demostrar lo anterior, postula un modelo en el cual los cambios de presión parcial de oxígeno, registrados por algún sensor renal, traen consigo la liberación del Factor Renal Eritropoyético

(REF) que a su vez activa al precursor sérico de la eritropoyetina. De acuerdo a este modelo, el riñón estaría jugando un papel regulador de la eritropoyesis al detectar cambios en la presión de oxígeno arterial.

Una vez mencionados algunos de los cambios fisiológicos que pueden causar la producción y/o liberación de eritropoyetina, cabe preguntarse cuál o cuáles podrían ser los mecanismos de acción de esta hormona.

En relación a este problema, algunos autores han postulado, por estudios citológicos realizados con células troncales de la médula ósea roja, que la eritropoyetina induce la proliferación de estas células pluri-potenciales (CFU-S), originando estirpes celulares comprometidas con la vía de diferenciación de la serie eritroide (BFU-E, CFU-E)⁽¹⁹⁾. En contraposición, hay quienes afirman que la eritropoyetina no solo estaría actuando a nivel de la diferenciación de las células troncales, sino que también se encuentra involucrada en los procesos de diferenciación y maduración de los precursores eritroides^(20,21,22,23). Sin embargo, existe un tercer punto de vista más reciente, en el cual se afirma que la eritropoyetina, no interviene directamente en la vía de diferenciación de las células formadoras de colonias en el bazo (CFU-S) hacia células comprometidas con la producción de eritrocitos (BFU-E, CFU-E), sino que única y exclusivamente interviene en los procesos de maduración y/o replicación que conllevan a la formación de proeritroblastos a partir de las colonias BFU-E y CFU-E.

Ahora bien, con respecto al modo de acción de la eritropoyetina

a nivel molecular, se han aportado evidencias poco claras. Así por ejemplo, Pavlov (24) al medir la cantidad de incorporación de ^{32}P en cuatro tipos de ácidos ribonucleicos (mRNA, hnRNA, tRNA y rRNA) calcula la concentración de cada uno de ellos en conejos normales y anémicos, observando que en este último caso, los 4 tipos de RNA se encuentran en mayor concentración. A partir de estos datos el autor concluye que el incremento en síntesis de mRNA implica una mayor rapidez en los procesos de diferenciación de las células troncales hacia el compartimiento de células eritroides. El incremento en la concentración de tRNA y rRNA en dichas poblaciones, indicaría un período más corto de maduración de las células proeritroblásticas. Es importante destacar que el autor no identifica los tipos celulares que se incrementan en la médula ósea, ni tampoco determina para qué codifican algunos de los mRNA que se elevan en su concentración. Más recientemente, se ha propuesto que la eritropoyetina actúa principalmente acelerando la transcripción del gene de globina en los precursores CFU-E, BFU-E (25). Se piensa también que la eritropoyetina se requiere para mantener la síntesis de DNA en proeritroblastos. Otros consideran que la eritropoyetina puede estar regulando la síntesis de algunos determinantes antigénicos característicos de los eritrocitos, así como también la síntesis de espectrina y lactato deshidrogenasa (26). En resumen, a nivel molecular, la eritropoyetina estaría influenciando la capacidad proliferativa y de maduración de las colonias sensibles a esta hormona ERC, que se encuentran formadas tanto de BFU-E como de CFU-E, a través

de los siguientes procesos:

- 1) Interacción de la Eritropoyetina con receptores específicos en la membrana de los precursores de los proeritroblastos.
- 2) Activación de un factor citoplasmático que transfiera el mensaje de la eritropoyetina al genoma de estas células, para la subsecuente,
- 3) Transcripción de moléculas de mRNA involucradas en la síntesis de proteínas características de los eritrocitos, tales como hemoglobina y espectrina, así como para la síntesis de algunos determinantes antigénicos encontrados en la membrana de los eritrocitos.

Sin embargo, no es factible considerar que una sola hormona esté regulando per se todos los procesos que caracterizan la diferenciación y maduración de los precursores eritroides, por lo que el papel de la eritropoyetina podría ser la de un modulador general que aunado a otros factores, dispare la maduración de las células comprometidas con la producción de células rojas. En efecto, Singer et. al. ⁽²⁷⁾; Golde et. al. ⁽²⁸⁾ y Nicholand D. Hoffman R. ⁽²⁹⁾, han demostrado que en presencia de eritropoyetina, varias hormonas esteroides son capaces de incrementar el crecimiento in vitro de precursores eritroides. A su vez, Leslie ⁽³⁰⁾, Stanley ⁽³¹⁾, Paul ⁽²⁵⁾ y otros más han observado que el grupo hem influye en la maduración de los proeritroblastos a partir de colonias eritroides inmaduras. A este nivel, los precursores eritroides guardan características distintivas con respecto a otros tipos celulares, por ejemplo, aunque el número de genes que codifican para la globina, localizados en el genoma de células espermáticas, es equivalente al número de

genes encontrados en células eritroides activas, la cantidad de mRNA en este último caso, es mucho mayor que en células no eritroides. Esto implica que la mayor capacidad de síntesis de globina, no está en función de la amplificación del gene que codifica para el monómero, sino de la velocidad de transcripción del mismo. Sin embargo, cuando en células proeritroblásticas se mide la cantidad de mRNA de globina, se observa que aunque exista la cantidad indispensable de este mensajero como para dirigir la síntesis de una cantidad importante de hemoglobina, ésta no se sintetiza a menos de que al cultivo se le adicione hem y una cantidad suficiente de hierro (32). Esto implica que cuando menos en la acumulación de hemoglobina, que es uno de los procesos que caracterizan el estado de maduración de los precursores eritroides, se encuentran involucrados varios factores.

Considerando lo anterior, dado que el hierro es un elemento indispensable en la síntesis de hemoglobina y que por ende puede ser un factor importante en los procesos de maduración de los precursores eritroides, en el presente trabajo se prestará particular atención a los mecanismos involucrados en el transporte de hierro durante la inducción de una mayor eritropoyesis.

Importancia del hierro para los seres vivos.

Proteínas involucradas en su transporte y almacenaje.

El hierro ha sido considerado como uno de los elementos más importantes que constituyen a los seres vivos. Es tal su importancia, que Neilands (33) considera que "la vida en cualquiera de sus formas,

sin hierro, es prácticamente inconcebible". En efecto, el hierro unido al anillo porfirínico, que es parte constitutiva del sistema de citocromos, se encuentra involucrado en el acarreo de electrones durante los procesos bioenergéticos encaminados a la síntesis de ATP. Participa a su vez como cofactor de un sin número de enzimas que catalizan tanto procesos degradativos como biosintéticos. En este sentido interviene por ejemplo, en la síntesis de DNA.

Por último, una de las funciones más importantes del hierro desde el punto de vista del intercambio gaseoso, es la de formar parte de la hemoglobina y mioglobina, encontrándose en estas dos proteínas alrededor de las dos terceras partes del hierro total del organismo.

Dado el pH y la composición iónica de los fluidos fisiológicos, el hierro se encuentra en su mayor parte en forma férrica, siendo poco soluble (33, 34), por lo que se hace imperiosa la necesidad de contar con un sistema de transporte así como de almacenaje de este elemento. Con relación a su transporte, existe un grupo de proteínas siderófilas conocidas como transferrinas*, que a pH fisiológico tienen una afinidad elevada por el hierro. En el segundo caso existe en particular una proteína, cuya estructura tridimensional le confiere una gran capacidad de retención de átomos de hierro. Esta proteína llamada ferritina, se encuentra en grandes concentraciones en centros de almacenaje del hie-

*Aunque el nombre genérico de las proteínas encargadas del transporte de hierro es el de transferrinas, existe en particular una proteína sérica transportadora de hierro llamada transferrina, siderofilina o serotransferrina.

ro, entre los cuales, el más importante es el hígado.

Sistema encargado del transporte de hierro:

Algunos aspectos sobre la estructura y función de la transferrina.

La transferrina es una glicoproteína de peso molecular entre los 78,000 y 80,000, cuyo centro principal de producción es el hígado, aunque puede sintetizarse también en médula ósea y bazo (35). Consta de una sola cadena polipeptídica en la cual se encuentran un par de sitios de unión al hierro con características similares entre sí (33,34). La estructura tridimensional de la transferrina humana es poco conocida, existiendo estudios más detallados de la transferrina de conejo en relación a la de cualquier otra especie. Estudios de cristalografía de rayos X, cuya resolución máxima es de 6 \AA , indican que la transferrina de conejo (36) consiste de un par de lóbulos, cuya forma puede compararse con la de una elipse de revolución, los cuales se encuentran inclinados 30° uno con respecto al otro. De acuerdo al mismo análisis, las dimensiones calculadas para esta proteína fueron de $95 \times 60 \times 50 \text{ \AA}$. A su vez, cada lóbulo posee cercano al sitio en el que se enlazan, un par de hendiduras, siendo aparentemente más pronunciada una de las dos. Por el momento se supone que dichas hendiduras representan el sitio en el cual se enlazan los átomos de hierro. En cuanto a este aspecto, aunque la transferrina puede en realidad unir metales distintos al hierro en ambos dominios, la afinidad por éste último es mucho mayor que para cualquier otro metal de transición (33). De hecho, el hierro es capaz de desplazar cualquier otro ión metálico que compita por los sitios de

unión a la transferrina. Esto nos indica el grado de especialización de esta proteína en cuanto al transporte de hierro. Sin embargo para estabilizar la unión del ión en forma férrica, se requiere la presencia de un ligando que preferencialmente es el bicarbonato. Cuando este anión se encuentra presente, la constante de asociación de la transferrina al hierro a pH y composición iónica fisiológicas, es de 10^{23}M^{-1} , existiendo por otra parte, una afinidad equivalente para ambos dominios en dichas condiciones (33,34). En relación a la disposición del bicarbonato en la molécula de transferrina, se sabe que cercano al sitio de unión del hierro, existe una región cargada positivamente, en donde se encuentran preferencialmente arginina y lisina. Esta región es considerada como el sitio de interacción de la transferrina con el bicarbonato, en donde opuesto al mismo quedaría ubicada la cavidad en la cual interactúa el hierro ligado a dicho anión.

Tomando en consideración el valor de la constante de asociación de la transferrina al hierro, podemos hacer notar que dicho valor es considerablemente alto, por lo que no fácilmente puede cederlo. En torno a este problema se han propuesto varios mecanismos que tratan de explicar a nivel fisiológico, cómo es descargada esta proteína para el uso posterior del hierro que transporta, sin que exista hasta la fecha, uno concluyente (37). Algunos de los mecanismos propuestos son los siguientes:

- 1) Se postula que durante la liberación del hierro ocurren cambios conformacionales en la molécula, de tal forma que la afinidad de ésta por el hierro disminuye.

2) En función de que la transferrina es mucho menos afín por el hierro ferroso, se plantea la posibilidad de que un primer proceso causante de la liberación del hierro sea la reducción del mismo.

3) Dado que el bicarbonato es un anión que fisiológicamente sirve como ligando para la unión del hierro a la transferrina, hay quienes piensan que una forma de liberar el hierro, es precisamente causando la extrusión del bicarbonato de la molécula.

4) De manera análoga, ya que la reacción del hierro con la transferrina causa la liberación de tres protones por átomo de hierro férrico fijado, se piensa que la protonación de esta proteína provoca la liberación del hierro. Este hecho explica la influencia del pH en la captación del hierro por la transferrina.

5) Por último se plantea que el ATP sea un mediador de la liberación del hierro, debido a que se ha sugerido que una concentración crítica de pirofosfato causa la extrusión de este elemento.

Cualquiera que sea el mecanismo por el cual se descarga la transferrina, resulta interesante destacar que algunos de los mecanismos propuestos hasta la fecha, lejos de ser excluyentes, pueden sucederse de manera complementaria.

Por otra parte, existen varias evidencias que indican que el hierro utilizado durante la eritropoyesis es el transportado por la transferrina, la cual lo cede con relativa facilidad a los precursores eritroides de la médula ósea así como a los reticulocitos que se encuentran en circulación (37). Debe mencionarse que no todas las células que requieren de

hierro pueden disponer de aquél asociado a transferrina; así por ejemplo, las células reticuloendoteliales tienen una capacidad muy limitada para utilizar el hierro transportado en el suero por esta proteína (37). En lo que respecta al proceso general por el cual los precursores eritroides* pueden hacer uso del hierro ligado a transferrina, puede decirse que esta última interactúa con un componente específico situado en la membrana de estas células; este compuesto al presentar características como especificidad, reversibilidad, saturabilidad así como por ser indispensable en la captación de hierro, se ha considerado como un receptor afín a la transferrina. Una vez realizada la interacción de la transferrina con su receptor, la cual depende tanto de la temperatura como del estado energético celular, el hierro es removido de esta proteína, siendo entonces captado por la ferroquelatasa que completa el ciclo por el cual se sintetiza el grupo hem. Por último, la apotransferrina o sea la transferrina sin hierro, puede volver a la circulación sin haber sido afectada durante este proceso.

En relación a la interacción de la transferrina con su receptor en reticulocitos, se han propuesto varios mecanismos que tratan de explicar a qué nivel es descargada esta proteína.

Un primer modelo supone que la transferrina cede el hierro tan pronto como interactúa con sus receptores en la superficie celular, sien-

*En realidad el tipo celular más comúnmente empleado es el reticulocito ya que varios autores, entre ellos Morgan, Kallis y Verhoef han demostrado que existe un comportamiento análogo entre precursores nucleados y no nucleados en cuanto a la captación de hierro.

do mediada la captación de este elemento a través de una reducción del hierro unido a esta glicoproteína en presencia de NADH (38).

Los dos modelos subsecuentes, involucran la internalización de esta proteína acarreadora de hierro por medio de una endocitosis. En el primero de ellos se postula que inmediatamente después de la internalización de la transferrina, esta libera el hierro directamente en el citosol, debiendo existir un acarreador intermediario que transporte el hierro hasta la mitocondria en donde se incorpora a la protoporfirina IX en forma ferrosa. En el segundo se considera que la transferrina después de ser internalizada, se mantiene dentro de la vesícula endocítica producida durante la invaginación de la membrana; este modelo contempla la posibilidad de que la vesícula endocítica se asocie a lisosomas para la subsecuente liberación de la transferrina, la cual sería en este caso el acarreador directo de hierro a la mitocondria. Ninguno de los modelos anteriores se encuentra descartado hasta la fecha, sin que existan a su vez, evidencias experimentales definitivas que los apoyen. No obstante, los trabajos realizados en este sentido comprueban el papel de la transferrina como transportador de hierro a células eritropoyéticas.

Más adelante, durante el desarrollo de este trabajo, se hará mención de algunos otros aspectos relacionados, sobre todo, con el metabolismo de la transferrina. Por el momento cabe decir que al menos su biosíntesis depende de los niveles de hierro sérico. McKnight et al. (39), han demostrado que los niveles de transferrina sérica se incrementan en gallinas con una alimentación deficiente en hierro. Este

incremento se refleja en un aumento paralelo en la biosíntesis de transferrina a nivel hepático, pudiéndose constatar un incremento de 2 a 3 veces en los niveles de mRNA de transferrina.

Dada la importancia de esta glicoproteína para el organismo, enfermedades tales como la atransferrinemia ⁽⁴⁰⁾, en la que existe una carencia en la síntesis de transferrina, provocan la muerte. Esto es debido en gran parte, a la imposibilidad de utilizar el hierro para el desarrollo del tejido eritropoyético, pudiéndose constatar bajos niveles de hemoglobina y volumen celular en estos enfermos.

O B J E T I V O

Desde principio de siglo, se comienzan una serie de trabajos encaminados a caracterizar la dinámica de los procesos involucrados en la formación de la sangre. Se identifica in vitro la actividad proliferativa de células en presencia de eritropoyetina, la cual parecía tener una aplicación clínica inmediata en el tratamiento de enfermedades relacionadas con el mal funcionamiento del tejido eritroide. Sin embargo, con el tiempo se eliminó la posibilidad de que un sólo factor pudiese aliviar todos aquellos desórdenes causados a nivel de algunos componentes del tejido sanguíneo, como por ejemplo anemias perniciosas, hemoglobinopatías, etc. Ciertamente, como ya se mencionaba con anterioridad, la proliferación y maduración de los precursores eritroides, no es únicamente inducida por la eritropoyetina, sino que se encuentran asociados otros factores como por ejemplo la síntesis de hem y por ende la disponibilidad de hierro que pueden tener estas células.

Aún cuando la transferrina parece ser la proteína encargada del transporte de hierro a precursores eritroides, para la síntesis de hemoglobina, esto no ha podido demostrarse en una forma concluyente. En efecto, la mayoría de los estudios realizados en este sentido, se han hecho in vitro, siendo muy pocos los ensayos realizados in vivo, que demuestran el papel de la transferrina como acarreador de hierro al sistema eritroide. El presente trabajo tiene la intención de describir el comportamiento de esta proteína y su relación con el transporte de hierro en conejos anémicos. Durante este estado, que es inducido experimentalmente al sangrar diariamente un volumen constante, se incrementa os-

tensiblemente la producción de células rojas; asociado a dicho aumento, se provoca una alteración en algunos otros parámetros tomados en cuenta, existiendo la posibilidad de que se encuentren íntimamente relacionados con la inducción en la proliferación del tejido eritroide.

MATERIALES Y METODO

Inducción de la anemia

Conejos Nueva Zelanda de dos a tres Kg. de peso, alimentados ad libitum con purina, fueron sangrados por punción cardiaca diariamente, durante 15 a 21 días. Con respecto al volumen de sangre removida, este se determinó de acuerdo al peso corporal de cada uno de los conejos utilizados durante el desarrollo de 3 experimentos. En el primero de ellos, se removieron en diferentes grupos de conejos, 3, 6, 9, y 12 ml. de sangre por Kg. de peso. En los dos experimentos restantes, se sangraron 10 ml. de sangre por Kg. de peso en cada caso. En el experimento en el que se removieron de 3 a 12 ml por Kg., se repuso el hierro perdido durante el sangrado, suministrando por vía intraperitoneal cada tercer día, hierro dextran (IMPERON. Laboratorios Lake-side). El total de hierro suministrado fué calculado en función de la concentración de hemoglobina por mililitro de sangre removida, asumiendo que en un gramo de hemoglobina hay aproximadamente 3.35 mg. de hierro. En los experimentos subsecuentes no se suministró hierro.

Colección y tratamiento de la sangre

La sangre fué extraída en jeringas de vidrio de 25 y 50 ml, previamente enjuagadas con ácido etilen dinitrilo tetracético, sal disódica (Titriplex III, Merck) al 20% p/v (20 gr. EDTA/100 ml. en 0.154 M. NaCl pH 7.3) usado como anticoagulante (41, 42). Una vez extraída la sangre, se colocó en probetas de vidrio sumergidas en hielo, verificando el volu-

men de sangre removida. Del total de sangre de cada una de las muestras, se tomaron alícuotas de 1 ml. para determinar hematocrito, concentración de hemoglobina, cantidad de células rojas y porcentaje de reticulocitos. El resto de la sangre se procesó en una centrífuga refrigerada DAMON-IEC-B20A en un cabezal de ángulo fijo a 10,000 rpm durante 10 minutos, separando el plasma de cada conejo para la determinación de los siguientes parámetros:

- a) Concentración total de proteína.
- b) Concentración de transferrina.
- c) Concentración de hierro.

Este último parámetro se determinó también en hígado y bazo.

HEMATOCRITO. - El volumen ocupado por el paquete celular después de centrifugar la sangre, expresado en porcentaje del volumen total, es decir el hematocrito, fué determinado usando tubos capilares sellados por uno de sus extremos. Los capilares fueron centrifugados durante media hora a 3000 rpm en una centrífuga clínica Adams-Dynac con cabezal de columpio CT-1350.

HEMOGLOBINA. - La concentración de hemoglobina fué determinada por el método de cianometahemoglobina ^(43, 44), efectuando las lecturas en un espectrofotómetro Zeiss PMQ II. a 540 nm.

Los valores correspondientes de hemoglobina, fueron calculados asumiendo un coeficiente de extinción milimolar de la cianometahemoglobina de 44 a 540 nm. y un peso molecular de la hemoglobina de 66,000 ^(42, 43). El mismo espectrofotómetro fué utilizado en todos los parámetros que re-

quirieron su uso.

Conteo de células rojas. - La cantidad de células rojas en las muestras, fué medida en un contador electrónico HAEMA-COUNT MK-2S, diluyendo la sangre 1:80,000 en solución salina fisiológica ISOTON (NaCl 7.93 gr/lt; EDTA 0.38 gr/lt; KCl 0.40 gr/lt; Na H₂ PO₄ 0.19 gr/lt; Na₂H PO₄ 1.95 gr/lt). Las diluciones fueron practicadas por duplicado, tomando primeramente 20 µl y aforando a 16ml. con la solución antes mencionada. De esta primera dilución se tomaron 100 µl y se llevó a un volumen final de 10 ml. para obtener la dilución requerida. Para cada lectura, el aparato toma una alícuota de 512 µl aproximadamente. Los datos son expresados entonces por el contador como millones de células rojas por centímetro cúbico.

Conteo de reticulocitos. - Este parámetro se midió efectuando una tinción supravital a una alícuota de sangre con azul de cresilo brillante al 1% en NaCl 0.9%; 0.46 gr. de citrato de sodio ⁽⁴⁵⁾. La tinción fué hecha colocando en un capilar una cantidad equivalente del colorante y de sangre previamente agitada, dejando reposar la mezcla en el capilar durante 30 min. en una cámara húmeda. Por último se puso una gota de sangre entre dos cubreobjetos, efectuando frotis de cada muestra. El porcentaje de reticulocitos en cada frotis fué calculado contando al microscopio alrededor de 1000 células por frotis.

Concentración de proteína total. - La concentración de proteína total en el plasma de cada muestra, fué determinada por el método de Biuret ⁽⁴⁶⁾.

Se colocaron 8 ml. del reactivo de Biuret y 2 ml del plasma diluído 1:10 y 1:20 en solución salina 0.9%, agitando la mezcla anterior en un Vórtex. Se dejó transcurrir la reacción durante 30 minutos al cabo de los cuales se leyeron las muestras a 540 nm. Para determinar la concentración de proteína se efectuó una curva patrón con albúmina de suero de bovino, para lo cual se preparó una solución base al 3% p/v. La curva patrón se muestra en la figura 1 y tiene como ecuación la siguiente:

Absorbancia = 0,050 (BSA mg/ml). Esta ecuación fué utilizada para los cálculos de proteína correspondientes. En cada lectura de las muestras problema, se verificaban cuando menos, la absorbancia de dos de los valores pertenecientes a la curva patrón.

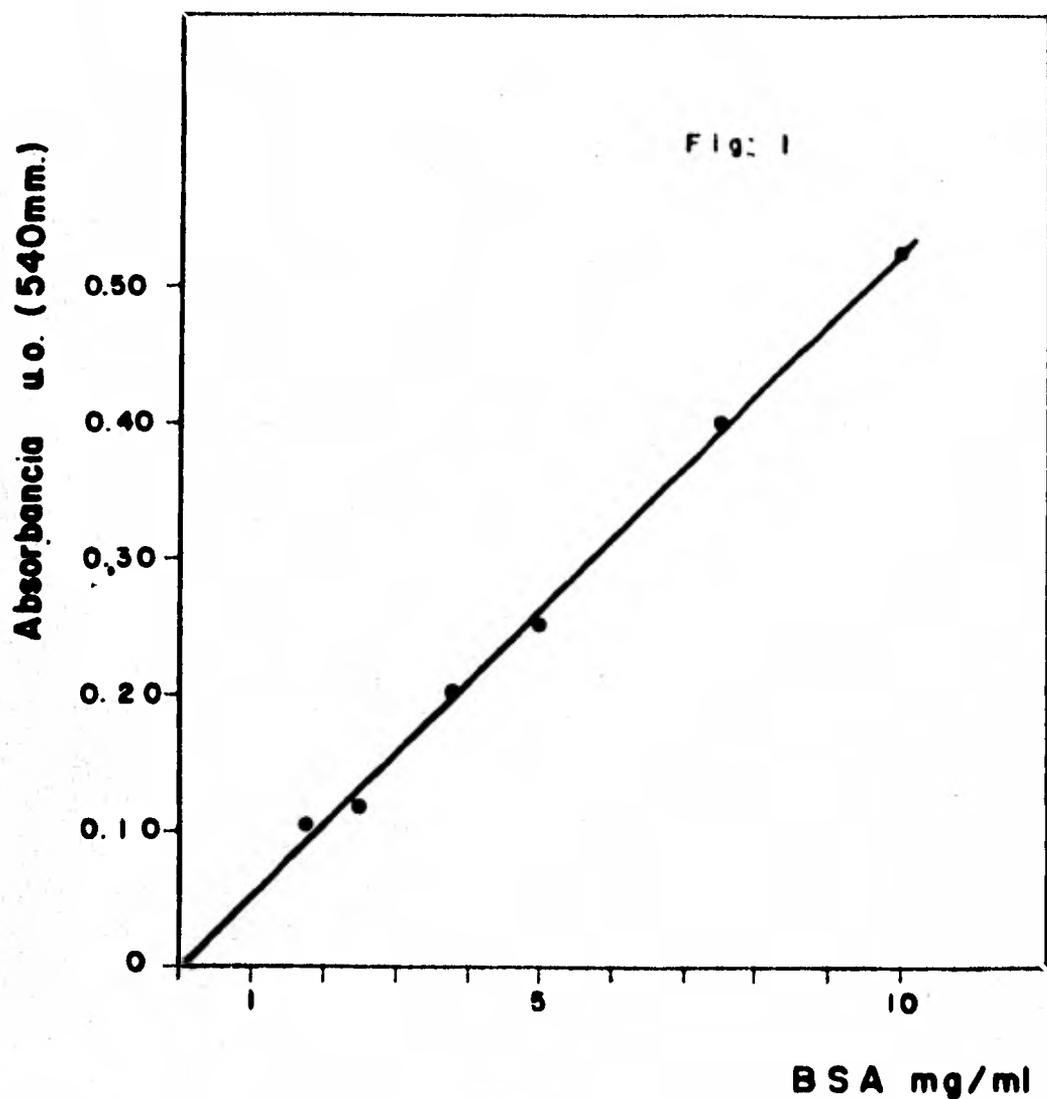


Fig. 1. - Curva patrón de Albúmina de Suero de Bovino. La linealidad de las diluciones seriadas a partir de una solución base al 3% p/v de BSA, se representa por la media de las determinaciones efectuadas por duplicado para cada dilución. El error estándar es despreciable. La recta trazada tiene como ecuación: $\text{Absorbancia} = 0,050 (\text{BSA mg/ml})$.

Concentración de transferrina. - Este parámetro fué calculado usando la técnica de inmunodifusión radial descrita por Mancini (47) et al.

En este sistema se utilizó un anticuerpo específico contra transferrina, obtenido a partir de transferrina pura de conejo. La purificación se efectuó usando plasma de conejo de acuerdo a la técnica descrita por Martínez-Medellín (48). El grado de pureza de la transferrina se verificó por electroforesis e inmunolectroforesis. En el primer caso, sólo se detectó una banda; observándose una banda bien definida y otra menos aparente al realizar la segunda técnica.

Una vez purificada la transferrina, se procedió a inmunizar un borrego con el fin de obtener anticuerpos contra esta proteína. Para esto, se dió un primer estímulo inyectando por vía intramuscular, 3 ml de una emulsión que contenía una parte de adyuvante completo de Freund (DIFCO Laboratorios) por una parte de transferrina con una concentración de 23 mg/ml. La emulsión fué preparada en un homogenizador Polytron. Quince días después se inocularon 3 ml de una mezcla de solución salina 0.9% y transferrina preparada con una parte de transferrina 25 mg/ml, por 5 partes de solución salina fisiológica. Un mes después se sangró para colectar la fracción de globulinas del suero. El título del anticuerpo se mantuvo inoculando con una periodicidad de 15 días una emulsión de 3ml de adyuvante incompleto y transferrina a la concentración antes mencionada durante aproximadamente 6 meses, dentro de los cuales periódicamente se sangraron 500 ml para la purificación de la fracción de globulinas contra transferrina.

La purificación de la fracción de globulinas del plasma se realizó por precipitación con sulfato de amonio. Para ello se preparó una solución sobresaturada de sulfato de amonio, disolviendo 400 gr. de sulfato de amonio (SIGMA) en un volumen final de 500 ml. de agua destilada a 70°C ajustando el pH de la solución a pH 7.4 con hidróxido de amonio concentrado. En seguida se diluyó el plasma 1:2 en buffer de fosfatos-salino (PBS) pH 7.4, llevándolo primeramente a un 20% de saturación con el objeto de eliminar el fibrinógeno. El sobrenadante de esta primera precipitación, se llevó a un 50% de saturación, descartando el sobrenadante y resuspendiendo el precipitado en buffer de fosfatos salino. Esta última fracción fué dializada primeramente contra agua destilada y luego se dializó exhaustivamente contra buffer de fosfatos salino, con el objeto de quitar el exceso de sulfato de amonio. Por último se congeló el dializado con una mezcla de acetona-hielo seco, con el objeto de liofilizar la fracción de globulinas correspondiente. Una vez purificado el anticuerpo, se procedió a titularlo para poder ser utilizado en la técnica de inmunodifusión radial.

Inmunodifusión radial. Esta técnica que esencialmente consiste en incluir una concentración constante de anticuerpo en una matriz de agar, en la cual se coloca el antígeno correspondiente, permite llevar a cabo un análisis cuantitativo del mismo. Dicho análisis se basa en la medición del área de los halos formados (ver figura 2) después de llevada a cabo la reacción antígeno-anticuerpo. El área es entonces proporcional a la concentración del antígeno bajo ciertos límites, que están en relación a la

concentración del anticuerpo. Con el fin de determinar la concentración óptima de antitransferrina para este sistema, se buscó la linealidad entre el área del precipitado y una variación proporcional de antígeno (trans

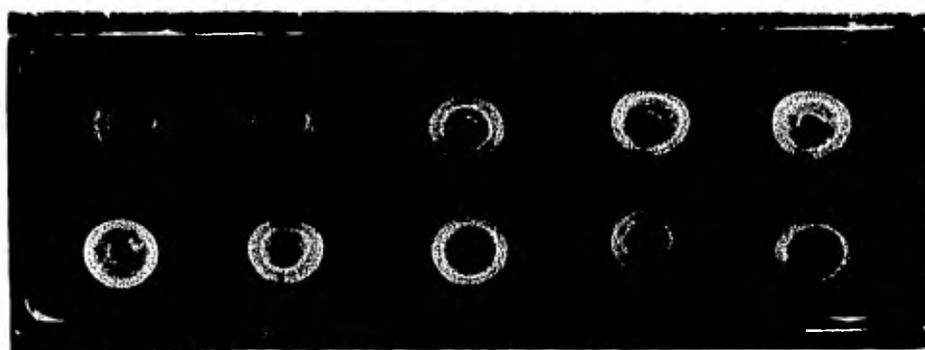


Fig. 2.- Inmunodifusión Radial. Cada halo de precipitación corresponde a una muestra diferente de suero de conejo anémico, el cual se hace reaccionar durante 24 horas con antitransferrina producida en borrego, a una concentración de 5.75 mg/ml.

ferrina), diluyendo de manera seriada una cantidad de transferrina pura, de la cual se conocía su concentración inicial (10.86 mg/ml). Se encontró que 5.75 mg/ml de antitransferrina, era una concentración adecuada para obtener una linealidad en un rango amplio de concentración de transferrina.

Curva patrón de valoración. - Se preparó agar-Noble (DIFCO) al 3% -

p/v en buffer de barbituratos pH 8.6 $\mu = .05$ (HELENA Laboratories) al cual se le agregaron 50 mg de azida de sodio; una vez mezclados, se fundió el agar a 70°C, tapándolo con gasa para evitar que se evaporara una cantidad importante de buffer. El agar fundido se colocó en un baño de temperatura constante a 57°C. A esta temperatura se agregó una solución concentrada de antitransferrina en buffer de barbituratos, para obtener una concentración final de 5.75 mg/ml una vez hecha la mezcla. De esta solución se colocaron 4 ml en placas de plástico sobre una superficie nivelada, dejando gelificar la mezcla Agar - Antitransferrina. Cuando solidificó el gel, se perforaron 10 orificios por placa con un perforador de 3mm de diámetro aproximadamente, quitando los restos del gel por medio de succión. En cada pozo se pusieron 4 μ l. de transferrina pura (10.86 mg/ml) a diferentes diluciones por duplicado. Con el objeto de ver la reproducibilidad de los valores obtenidos, la curva patrón se corrió en 5 placas diferentes con duplicado para cada punto, dentro de una misma placa. El coeficiente de variación máximo obtenido para cada valor en las dos condiciones fué del 5%. La curva patrón promedio se muestra en la Fig. 3. La ordenada al origen equivale al área del pozo perforado. El área de cada precipitado se tomó como equivalente a medir el cuadrado del diámetro por la siguiente razón: Como la variación del área es directamente proporcional a la concentración del antígeno podemos escribir:

$$A_f = m (Ag) + A_i \text{ donde } A_f = \text{área del precipitado y}$$

$$A_i = \text{área inicial del pozo}$$

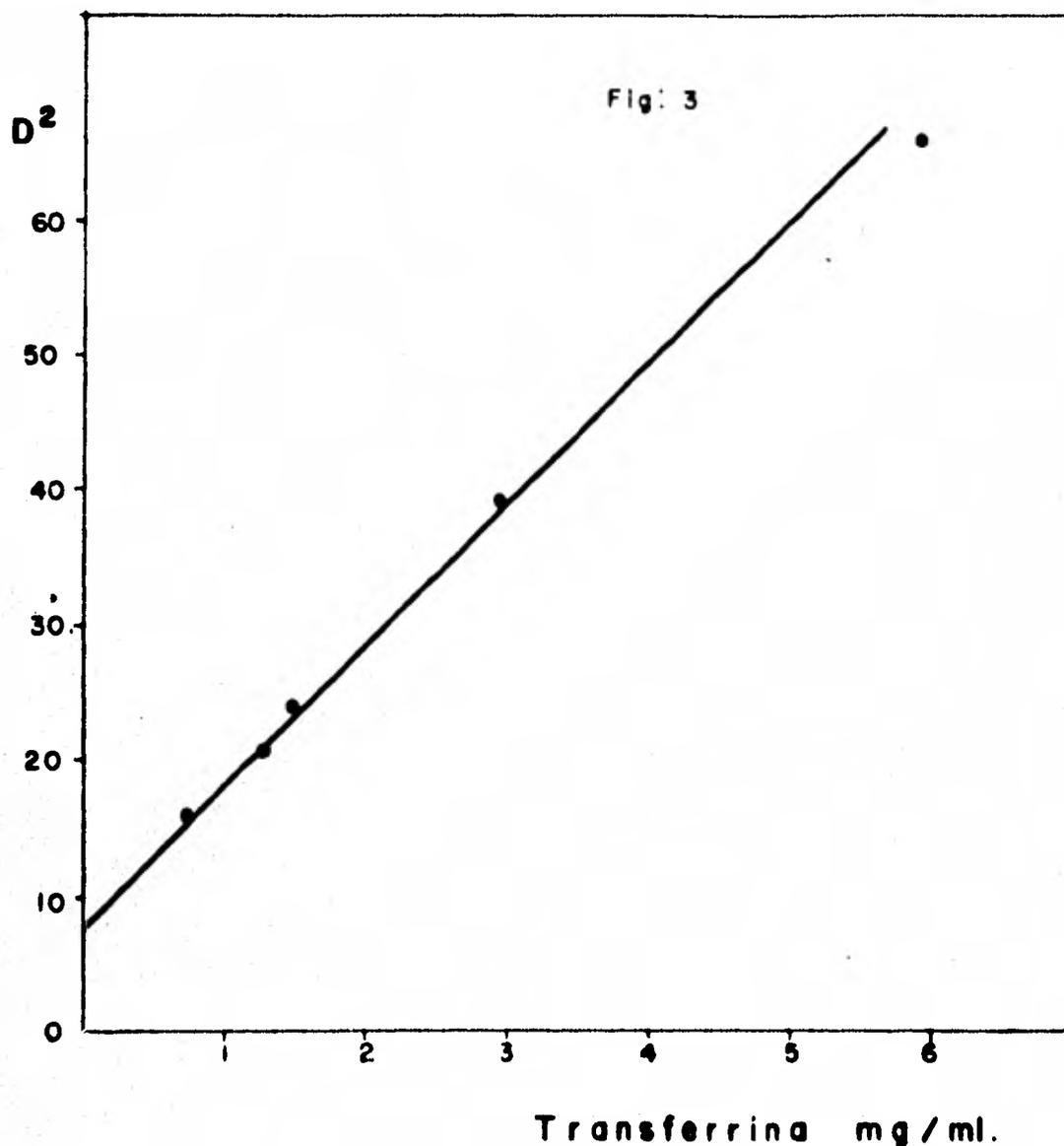


Fig. 3.- Curva Patrón de transferrina. La variación entre el área de precipitación radial y la concentración del antígeno (transferrina pura) es lineal en un rango de concentración de este último de 1 a 6 mg/ml y 5,75 mg/ml de antitransferrina. La recta trazada tiene como ecuación: $D^2 = 11,18 (Tr) + 9,7$ donde Tr expresa la concentración de transferrina en mg/ml. El error estándar es despreciable.

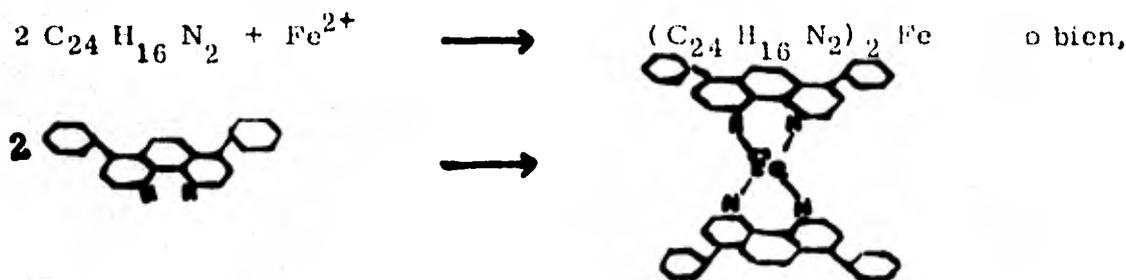
luego si consideramos que el área A_f es la correspondiente a un círculo $\Rightarrow \pi r^2 = m (Ag) + Ai$; pero como $r=1/2 D$ entonces $r^2=1/4D^2$
 . . . $\pi 1/4D^2 = m (Ag) + Ai$ donde si consideramos la razón $\pi/4$ como 3.1416/4 podemos considerarla como ≈ 1 por lo que la expresión anterior se puede resumir como: $1 \cdot D^2 = m (Ag) + Ai \approx D^2$. En la figura 3 se expresan los valores equivalentes de m y Ai respectivamente para este sistema.

La cuantificación de transferrina en el plasma de los conejos experimentales, se hizo colocando 4 μ l de plasma en cada pozo por duplicado. Una vez colocado el antígeno en cada placa éstas se incuban a temperatura ambiente en una cámara húmeda por 24 horas, tiempo requerido para que se establezca la reacción antígeno-anticuerpo y por tanto el área final del precipitado. Después de este período de incubación, se efectuaron las mediciones correspondientes.

Determinación de hierro sérico. - La concentración de hierro sérico se determinó espectrofotométricamente haciendo uso del ácido batofenantrolín disulfónico, el cual reacciona con el hierro libre dando un compuesto colorido con un máximo de absorción a 535 nm. La técnica empleada es una variante del método de Shade⁽⁴⁹⁾ elaborada por los laboratorios Merck, por lo que se usó el juego de reactivos correspondiente.

El principio en el que se basa la determinación, consiste en remover el hierro unido a proteínas siderófilas, principalmente el ligado por la transferrina, a través de un cambio brusco en el pH del suero. Para este propósito se utiliza HCl 1N. Una vez liberado el hierro, se

procede a precipitar las proteínas séricas con ácido tricloroacético 3 M con el objeto de eliminar cualquier interferencia por dispersión debido a algún componente sérico. Después de centrifugar se toma el sobrenadante en el cual se encuentra el hierro libre, este último es entonces reducido con ascorbato de sodio. El hierro reducido se hace reaccionar con batofenantrolina a un pH de 5.5 aproximadamente, por lo cual al sobrenadante se le adiciona acetato de sodio al 30%. El cálculo de hierro se hace entonces en función del cambio de coloración en el sobrenadante, con respecto a la coloración de una solución patrón de hierro cuya concentración es de $1\mu\text{g/ml}$ de Fe. La reacción del hierro ferroso con dos moléculas de ácido batofenantrolín disulfónico puede esquematizarse de la siguiente manera:



Para la determinación de hierro se procedió primeramente a lavar el material de vidrio calentándolo en una solución de extrán al 10% v/v a 95°C durante una hora. Enseguida se enjuagó con agua destilada y finalmente con agua desionizada, para evitar cualquier residuo de hierro. Una vez limpio el material se prepararon las siguientes soluciones empleando en todos los casos agua desionizada, la cual se preparó pasando agua destilada a un desmineralizador Corning LD 2A, alcanzando una pureza

de 1 mega ohm/cm:

Solución de HCl 1N v/v (Merck traza hierro $5 \times 10^{-5} \%$)

Solución de TCA al 40% p/v (Merck traza hierro $1 \times 10^{-3} \%$)

Solución de Acetato de Sodio 30% p/v (Merck traza hierro $5 \times 10^{-4} \%$)

Para cada determinación se pipetearon 2 ml de plasma a los cuales se les agregó 1ml de HCl 1N, agitando brevemente en un Vórtex. Después de agitados los tubos, se dejaron a temperatura ambiente 45 minutos; enseguida se les agregó 1ml de ácido tricloroacético al 40% centrifugando la mezcla durante 30 minutos a 10,000 rpm a 4°C, con el fin de compactar el precipitado. A dos mililitros del sobrenadante se les agregó un mililitro de acetato de sodio al 30% y aproximadamente 5mg de ascorbato de sodio. Esta última mezcla se agitó perfectamente bien hasta disolver el ascorbato de sodio. Una vez disuelto, se agregó un mililitro de una solución de batofenantrolina al 0.1% p/v en buffer de fosfatos pH 5.5, virando la solución a un color rosado. Para leer esta última solución en el espectrofotómetro a 535nm, se prepararon un patrón y un blanco, para lo cual se siguió el mismo procedimiento antes descrito, sustituyendo el suero por la solución patrón de hierro y por agua desionizada respectivamente.

La concentración de hierro se expresó como μg de Fe por 100 ml de plasma y se calculó a partir de la siguiente expresión:

$$\text{Hierro en plasma } \mu\text{g}/100 \text{ ml} = \frac{\text{Absorbancia en el plasma} \times 100}{\text{Absorbancia patrón} (\mu\text{g}/\text{ml})}$$

Determinación de hierro no hemínico en hígado y bazo

Con el fin de determinar el hierro remanente en el hígado y en el bazo de conejos anémicos, se sacrificaron éstos por exsanguinación, después de alcanzar de 15 a 20 días de sangrado diario, extirpando el hígado y bazo de cada animal. Enseguida se lavaron los órganos exhaustivamente con solución salina fisiológica, en frío. Cada órgano se limpió perfectamente, removiendo todo el tejido conectivo y grasa adheridas, pesando cada uno de ellos después de esta operación. La determinación de hierro en ambos casos se realizó de la siguiente manera:

1) Se hizo un homogenado del órgano completo, colocando a este en un volumen de agua desionizada, cuatro veces mayor el peso de los tejidos frescos. (ml/gr peso fresco)

2) Del homogenado se pipetó por duplicado 1 ml, transfiriéndolo a un volumen final de 100ml en una mezcla de ácidos Clorhídrico y Tricloroacético, con una concentración final de 3N para el HCl y 1.8 M para el TCA.

3) De esta dilución, se pipetearon 10ml en tubos de vidrio de 30ml.

4) Los tubos se colocaron cerrados con tapones de corcho recubiertos con parafilm en un baño de temperatura constante a 65°C dejando digerir el tejido en estas condiciones durante 24 horas.

5) Una vez digerida la muestra, se transfirieron 2 ml del sobrenadante de cada una de ellas, por duplicado, a tubos de vidrio enjuagados con agua desionizada. Se determinó la concentración de hierro de

esta muestra de forma análoga a la determinación de hierro sérico.

Los datos fueron expresados como μg de Fe totales y μg de Fe por gramo de tejido fresco.

Los cálculos en el primer caso se efectuaron multiplicando los $\mu\text{g Fe/ml}$ por el volumen total del homogenado y al dividir este último valor entre el peso fresco del órgano, se calcularon los μg de hierro para el segundo caso.

RESULTADOS

En esta parte del trabajo se describen los resultados obtenidos en tres experimentos consecutivos. En cada uno de ellos se utiliza como animal experimental conejos Nueva Zelanda blancos, a los cuales se les provoca un estado de anemia, al extraer diariamente un volumen de sangre constante. Aunque la inducción de un estado de anemia por sangrado crónico, es un factor común en los tres experimentos realizados, dicho estado se provocó en diferentes condiciones, mismas que serán descritas de manera individual. Por otra parte, con el afán de poder contrastar los resultados obtenidos en cada caso, algunos de los parámetros cuantificados en los tres experimentos, son prácticamente los mismos. En relación a este punto, debe mencionarse que aún cuando participé activamente en el desarrollo de cada uno de los experimentos, la gran cantidad de parámetros a medir en los mismos, hizo que mi responsabilidad principal fuera la de cuantificar los niveles de proteína sérica total, transferrina y hierro séricos, así como el hierro no hemínico en hígado y bazo. No obstante, debido a las necesidades del análisis e interpretación de los resultados, es indispensable el presentar aquí, parcialmente, los datos de otros parámetros medidos, como lo son número de células rojas, hemoglobina, número de reticulocitos y hematocrito.

Antes de describir particularmente los resultados obtenidos en los experimentos realizados, daré las características más genera-

les del tipo de anemia inducida al extraer diariamente un volumen fijo de sangre. En otros trabajos (50,51), se ha observado que tanto el número de células rojas por mililitro, como la concentración de hemoglobina por 100 mililitros y el hematocrito, decrecen bruscamente durante los primeros 6 días después de extraer diariamente 10 mililitros de sangre por kilogramo de peso. Esta disminución es compensada por un incremento en la producción de células rojas, la cual se refleja en un aumento en el número de reticulocitos circulantes. El aumento de dicha población, no es indefinido, sino que después de incrementarse alrededor de 3 veces con respecto a las concentraciones normales, se mantiene entonces constante. De esta manera se logra establecer un equilibrio entre el número de células rojas removidas y el número de células producidas diariamente. En este equilibrio pueden analizarse las características de la anemia inducida, dado que las poblaciones se mantienen ahora constantes. En relación a este punto, se ha demostrado que aparece en la circulación una nueva población de células rojas, cuyo tamaño es comparativamente mayor con respecto a las normales, teniendo sin embargo, una concentración de hemoglobina menor en relación a su volumen. Las características anteriormente citadas, colocan a este tipo de anemia dentro de las anemias consideradas como macrocíticas.

Primer experimento. -

Proliferación del tejido eritroide del conejo como respuesta a una estimulación progresiva provocada por la remoción de diferentes

volumenes de sangre.

En este experimento, se trató de conocer los límites de la capacidad de respuesta fisiológica del conejo, ante un estímulo por sangrado progresivo. A cuatro grupos de conejos se les extrajo 3, 6, 9 y 12 ml de sangre/ kg de peso respectivamente, con el objeto de caracterizar los valores críticos de dicha respuesta.

La figura 4, ilustra la tendencia que sigue la concentración de hemoglobina /100 ml. durante el sangrado diario en los diferentes grupos experimentales. Puede hacerse notar que durante los primeros cuatro días del experimento, se provoca un descenso en la concentración de este parámetro en los cuatro grupos, siendo menos evidente en el que se extrae un volumen de sangre menor. En los días subsecuentes tienden a aumentar los niveles de hemoglobina de una manera mas o menos paralela.

Por otra parte, conociendo el volumen de sangre removida en cada caso, se puede calcular la cantidad de hemoglobina extraída en dicho volumen. Este valor es importante, ya que en función del mismo, se puede saber la cantidad de hierro que está perdiendo cada conejo diariamente, por efecto del sangrado, si asumimos que un gramo de hemoglobina tiene 3.35 mg de hierro. En la figura 5 puede observarse que la remoción de hierro en el grupo de 3ml/kg de peso, no varía significativamente a lo largo del experimento. En los grupos restantes se observa que el hierro eliminado durante el sangrado, disminuye consecutivamente durante los primeros cuatro días. Esto es explicable, ya que en el -

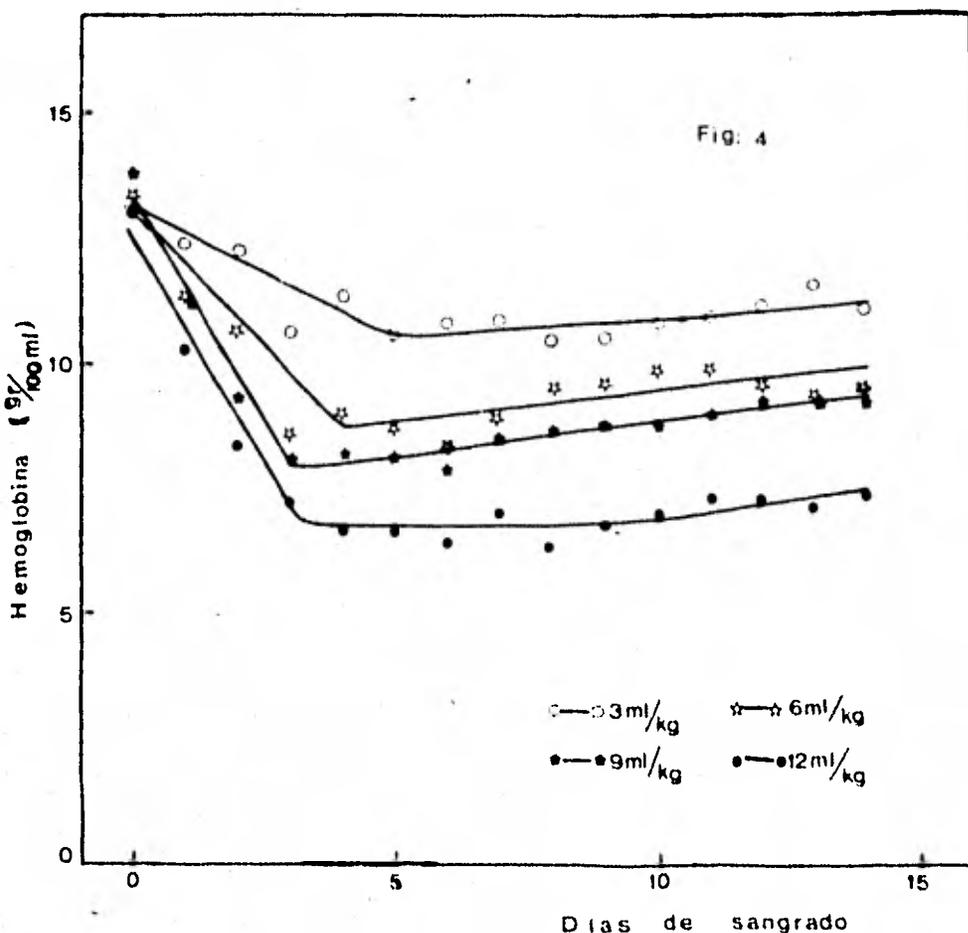


Fig. 4. - Variación de la concentración de hemoglobina durante la inducción de un estado de anemia por la remoción de diferentes volúmenes de sangre. Las rectas trazadas para cada grupo experimental fueron calculadas por el método de mínimos cuadrados. Se expresan sin embargo los valores experimentales sin ajustar.

mismo intervalo ocurre un descenso generalizado en la concentración de hemoglobina. Con el afán de comparar de una manera práctica las diferencias existentes en cada caso, se han trazado las rectas que mejor se ajustan a los valores experimentales, haciendo uso del método de mínimos cuadrados. Para ello se tomaron dos intervalos. El primero abarca del primer día de sangrado (día cero) hasta el cuarto día (día tres

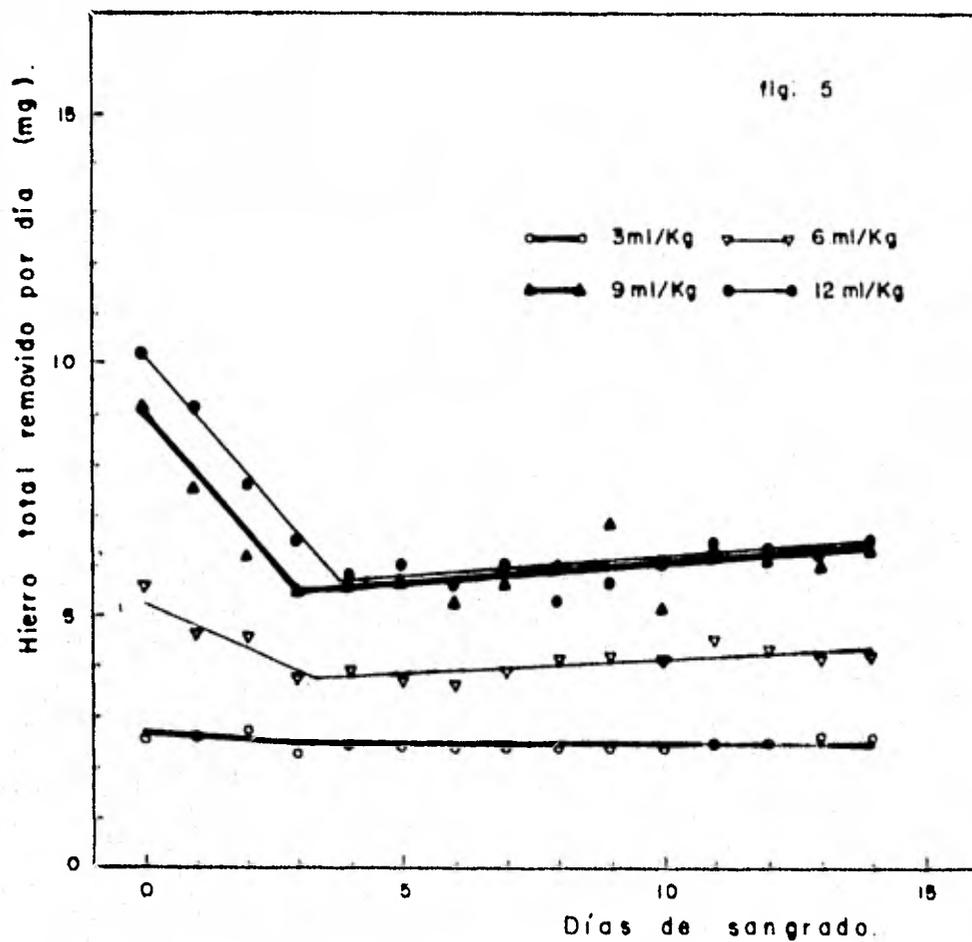


Fig. 5. - Hierro total extraído durante la remoción de diferentes volúmenes de sangre. Los valores de hierro extraído se calcularon en función de la cantidad de hemoglobina extraída para cada grupo. El cálculo se efectuó asumiendo que un gramo de hemoglobina equivale a 3,35 mg. de hierro. Las rectas fueron trazadas por el método de mínimos cuadrados.

en la gráfica) y el segundo, del cuarto al quinceavo día. Los coeficientes de correlación promedio para cada intervalo, son de 0.98 con un nivel de significancia del 99% para el primero y de 0.60 con un nivel de significancia del 95% para el segundo. Del primero al cuarto día, los grupos de 6, 9 y 12 ml/kg de peso, tienen una pendiente negativa, siendo cercana a cero la correspondiente al grupo de 3ml/kg de peso. Esto implica que en este último grupo, la cantidad de hierro removido es constante, mientras que en los restantes la cantidad de hierro extraído por día es cada vez menor. A este respecto es necesario destacar que la magnitud de la pendiente es un índice de la velocidad de remoción de dicho elemento, teniendo un valor similar en los grupos de 9 y 12 ml/kg de peso. La magnitud exacta de las pendientes para este primer ajuste lineal, es la siguiente:

$$3\text{ml/kg de peso} = 0$$

$$6\text{ml/kg de peso} = -0.57$$

$$9\text{ml/kg de peso} = -1.23$$

$$12\text{ml/kg de peso} = -1.26$$

Describamos ahora lo que sucede en cada grupo experimental a partir del cuarto día de sangrado, hasta el quinceavo. El grupo de 3ml/kg de peso, mantiene su valor constante. En los demás se observa un hecho peculiar. En lugar de seguir disminuyendo la cantidad de hierro extraído, ésta aumenta ligeramente. En términos del ajuste lineal efectuado, este hecho se confirma, ya que el signo de la pendiente es positivo. Por segunda vez se observa que el comportamiento de los grupos de 9 y 12 ml/kg

de peso es similar. En efecto, mientras la pendiente en el grupo de 9 ml/kg de peso es de +0.070 en el de 12 ml/kg de peso es de +0.068. Por su parte la pendiente del grupo de 6 ml/kg de peso es de +0.063 la cual es más cercana a la de los grupos de 9 y 12 ml/kg de peso, en relación a su valor anterior.

Hasta aquí, los datos que se presentan sugieren un comportamiento similar para los grupos de 9 y 12 ml/kg de peso, teniendo un comportamiento distinto los grupos de 3 y 6 ml/kg de peso, en cuanto a la estimulación por sangrado.

Mencionemos ahora la cantidad total de hierro perdido por el animal en cada caso, en los 16 días de sangrado. En el grupo de 3ml/kg de peso, se retiró un total de 36.28 mg; en el de 6ml/kg de peso 63.70; en el de 9ml/kg de peso 93.95 mg y finalmente en el de 12ml/kg de peso 99.55 mg. En este experimento como se mencionó antes, se repuso aproximadamente la misma cantidad de hierro extraído, inyectando cada día intraperitonealmente, hierro dextran.

Cuando se analiza el número de células rojas por ml en cada caso (datos no presentados aquí) se observa una cinética similar a la de la concentración de hemoglobina, aunque el valor crítico en cuanto al número mínimo de estas células, se alcanza en el sexto día de sangrado (grupos de 9 y 12 ml/kg de peso solamente) en lugar del cuarto día, como sucede en cuanto a la concentración de hemoglobina. A su vez, el número de células rojas en el grupo de 3ml/kg de peso, disminuye ligeramente durante los primeros 4 días, para luego mantenerse

relativamente estable. De manera general, podría destacarse que existe un comportamiento similar en los grupos de 9 y 12 ml/kg de peso, mientras el grupo de 6 ml/kg de peso, presenta un comportamiento intermedio entre el grupo de 3 ml/kg de peso y los dos anteriores.

Un tercer parámetro medido fué el número de reticulocitos circulantes. Cuando durante los diferentes días del experimento, se mide esta última población celular, se aprecia, como ya se ha destacado en otros trabajos ⁽⁵⁰⁾, un incremento significativo en el número absoluto de estas células. Este incremento no es, sin embargo, igual en los diferentes grupos experimentales. Por el contrario, depende del volumen de sangre que se remueve. El grupo de 3ml/kg de peso, duplica el número de reticulocitos, con respecto al número normal encontrado en el día cero; los conejos de 6 ml/kg de peso casi triplican dicho valor, encontrándose un incremento de alrededor de 4 veces en los grupos de 9 y 12 ml/kg de peso respectivamente. Si se considera que proporcionalmente se estimula en mayor medida a los grupos de 12 ml/kg de peso, puede pensarse que se ha alcanzado una respuesta máxima en relación a la producción de este tipo celular.

Una vez conocidas las variaciones en los parámetros hematológicos antes considerados, se procedió a analizar el contenido de proteína sérica total en el curso de este primer experimento. En la figura 6, en la cual se expresa el promedio de la concentración de proteína en mg/ml para los cuatro grupos, puede notarse un aumento en este parámetro a partir del séptimo día. Dicho incremento, que se mantiene hasta el fi-

nal del experimento, es tan sólo de un 15% en relación al valor encontrado en condiciones normales, lo cual no es significativo.

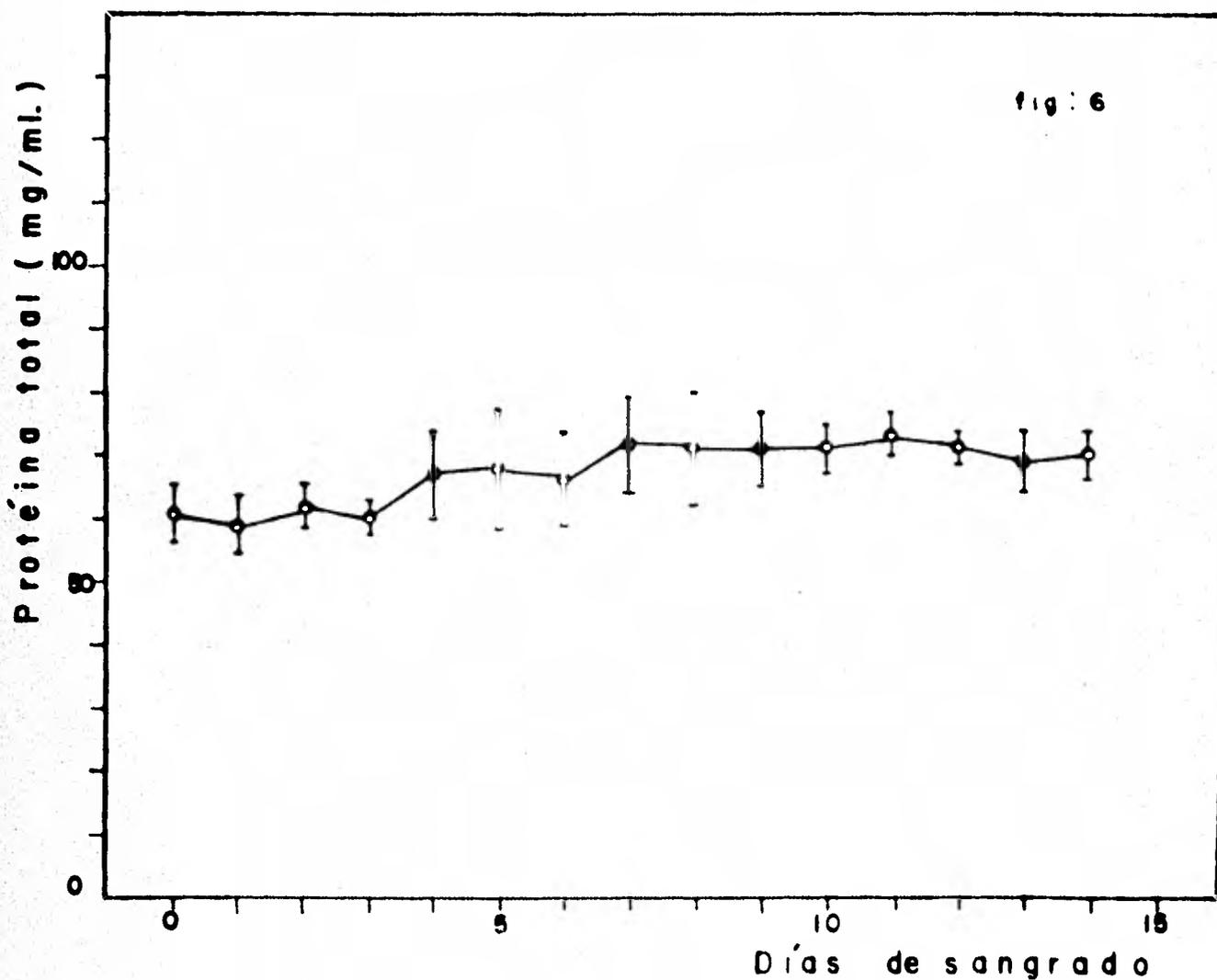


Fig. 6. - Variación de la concentración total de proteína durante la inducción de un estado de anemia por sangrado. Cada valor representa el promedio de los tres grupos experimentales (3, 6, 9 y 12 ml de sangre por kg de peso). Se representan en cada punto la desviación estándar correspondiente.

Este primer análisis del contenido total de proteína, fué seguido de la determinación específica de la concentración de transferrina, ya que esta proteína se sabe que transporta hierro a centros hematopoyéticos, mismo que es utilizado a su vez para la síntesis de hemoglobina. En la figura 7 se puede apreciar la cinética seguida por esta proteína durante el curso del experimento. Una apreciación inmediata, es que no existe un comportamiento distintivo en cada grupo, sino que se presenta una tendencia generalizada a incrementar el contenido sérico de esta glicoproteína.

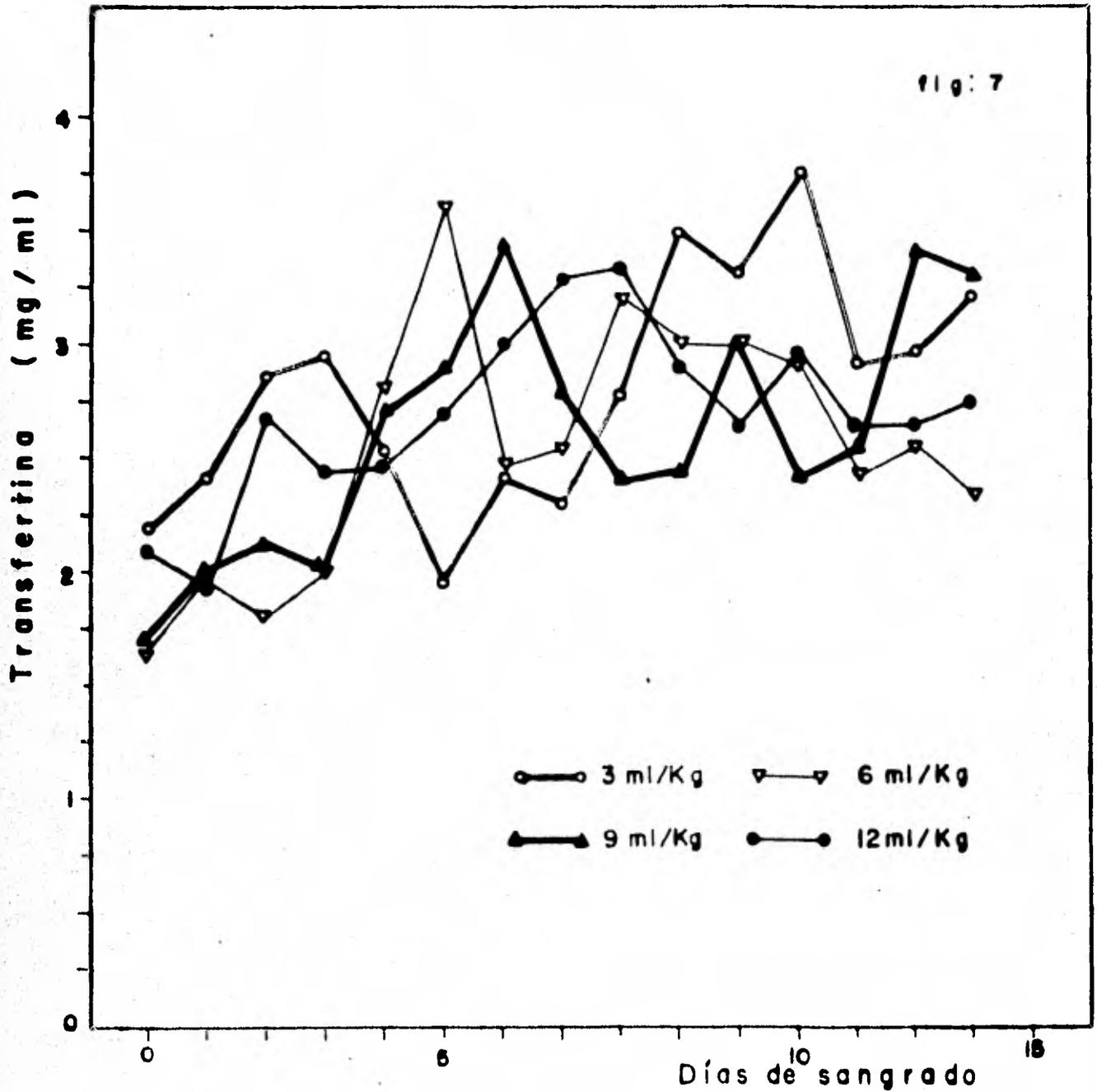


Fig. 7. - Efecto de la remoción de diferentes volúmenes de sangre sobre la concentración de transferrina sérica. Los puntos representan los valores promedio para cada grupo.

En la figura 8 se expresa la concentración promedio de los cuatro grupos experimentales. En ella, la curva representada es de tipo exponencial, cuyo máximo valor alcanzado a partir del octavo día, se mantiene en lo general estable hasta el último día del experimento. Cuando se compara el valor inicial con respecto al valor promedio máximo alcanzado a partir del octavo día en adelante, éste último resulta ser un 50% mayor en relación al primero. Dicha diferencia es significativa ($p=,001$). A su vez, al ser equivalente para los cuatro grupos experimentales, su estimulación no depende de manera directa del volumen de sangre extraída. A este respecto, si como se ilustra en la figura 5, el hierro a restituir está en función del volumen total de hemoglobina extraída diariamente, cabe preguntarse cuales son las implicaciones de un aumento único en la concentración de transferrina.

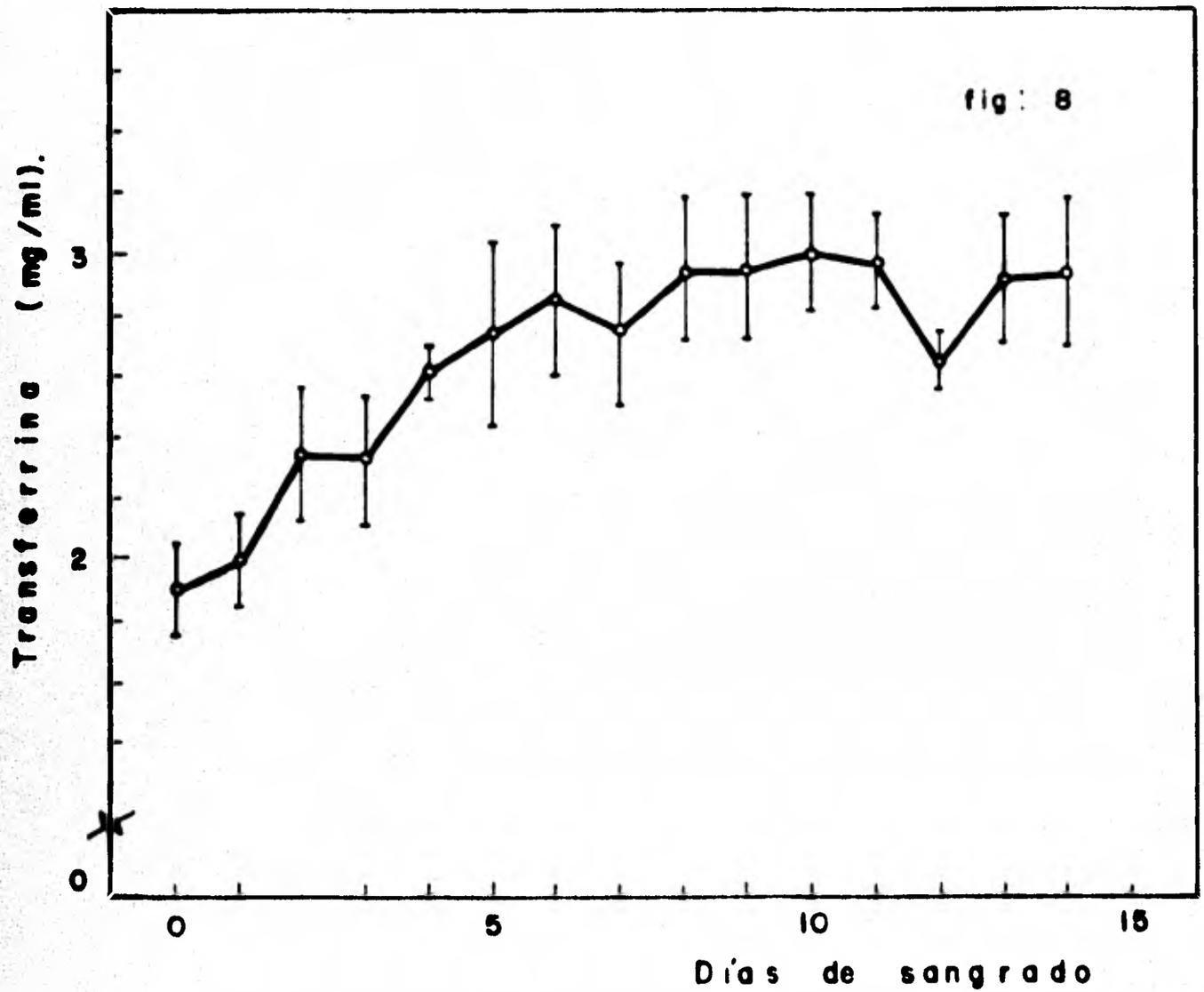


Fig. 8. - Tendencia promedio de la concentración de transferrina sérica para los diferentes grupos experimentales (3, 6, 9 y 12 ml/kg de peso). Los valores representan la media de los 4 grupos anteriores, indicándose en cada uno la desviación estándar correspondiente.

Una primera correlación de los valores obtenidos para este parámetro, puede hacerse tomando en cuenta el número de reticulocitos que aparecen en la circulación en cada caso. La figura 9 expresa la razón de cambio que existe entre el número de reticulocitos y la concentración de transferrina con respecto al volumen de sangre removida. Esta proporción o razón de cambio, que resulta de dividir el número absoluto de reticulocitos entre la concentración de transferrina, fué calculada para cada grupo, a partir de los valores promedio presentes en el equilibrio al final del experimento. Este equilibrio fué tomado en cuenta desde el octavo día de sangrado, en el cual como ya se mencionó con anterioridad, tanto la concentración de transferrina, como el número de reticulocitos, permanecen relativamente estables. Al analizar la relación anteriormente descrita y representada en la figura 9, se puede apreciar que esta razón de cambio guarda una proporción directa conforme el volumen de sangrado se incrementa, siendo esta menos clara, cuando consideramos el grupo de 12ml/kg de peso. Esta proporcionalidad queda expresada entonces por el ajuste lineal que puede hacerse tomando en cuenta los valores promedio de los grupos de 3, 6 y 9ml/kg de peso respectivamente. El coeficiente de correlación obtenido para estos tres grupos es de 0.98, teniendo una significancia del 99%. No obstante el alto nivel de significancia obtenido en este ajuste lineal, para los grupos considerados, es importante hacer énfasis que la linealidad se pierde cuando al conejo se le estimula sangrando un volumen mayor, equivalente en este caso a 12 ml/kg de peso. Es claro que independientemente de un aumento proporcional, en

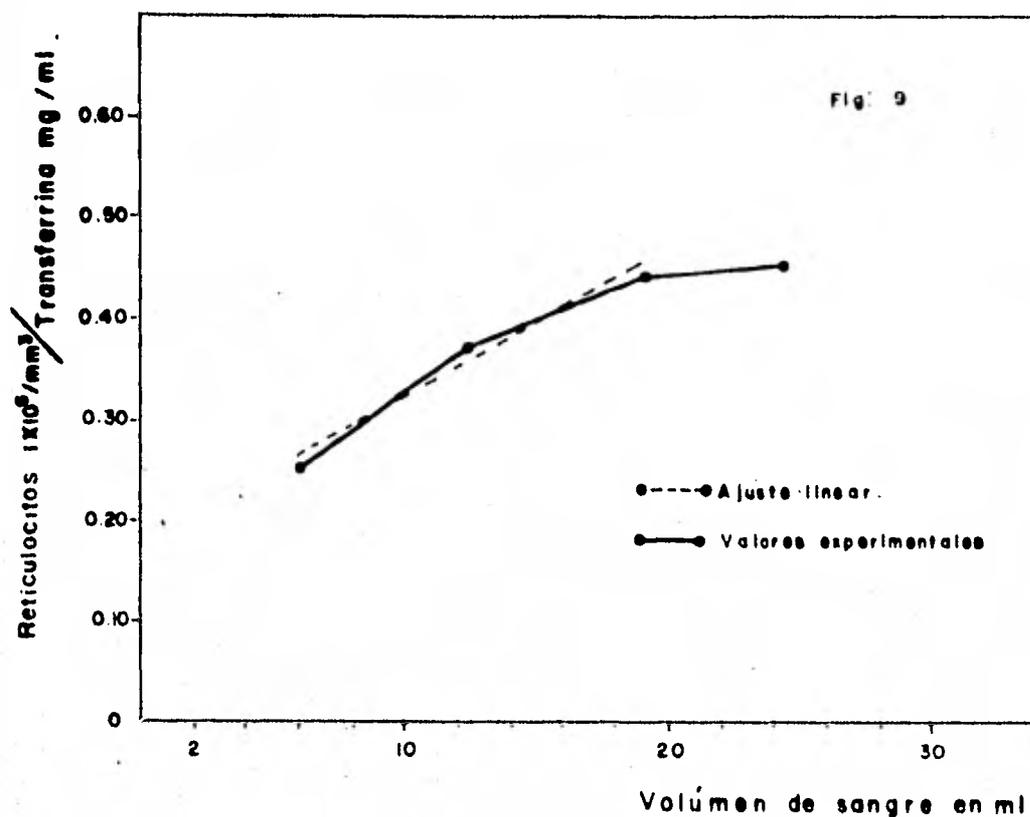


Fig. 9. - Razón de cambio reticulocito/transferrina durante la remoción de diferentes volúmenes de sangre. La línea sólida representa los valores experimentales y sin ajuste. La línea discontinua representa el ajuste lineal por mínimos cuadrados para tres de los 4 grupos sometidos a experimentación.

cuanto al grado de estimulación por sangrado, la razón de cambio reticulocito/transferrina, no se incrementa de manera igualmente simétrica. Para que este valor aumentara simétricamente, tanto el número de reticulocitos, como la concentración de transferrina, tendrían que tener un valor mayor a los obtenidos experimentalmente. Si pensamos que para una mayor producción de reticulocitos, es necesario un mayor aporte de hierro, probablemente éste no se da en función de haber alcanzado, en este último caso, la máxima concentración de transferrina circulante. Esto explica que el cociente reticulocito/transferrina, sea semejante en los grupos de 9 y 12ml/kg de peso. En relación a este punto, en la última parte del presente trabajo, se describirán los resultados obtenidos en un experimento, en el cual, a un grupo de conejos después de haberlos sometido a un proceso de anemia, se les suministra intravenosamente transferrina pura de conejo. Por el momento se hará mención de un segundo experimento, encaminado a caracterizar el efecto que pueda tener el suministro de hierro intraperitoneal, en cuanto al comportamiento que presentan algunos de los parámetros antes mencionados, a lo largo de un proceso de anemia.

Segundo experimento

Efecto del suministro exógeno de hierro sobre la producción de sangre, en un estado de anemia inducida por sangrado crónico en el conejo.

Los cambios observados en el experimento anterior, nos permiten inferir una profunda modificación en el sistema transportador de hierro. Dado que este cambio puede estar ocasionado como respuesta a la anemia o bien como respuesta a la inyección intraperitoneal de hierro, se decidió en este experimento, medir la influencia de dichos factores. Para el desarrollo de este segundo experimento, a un lote de conejos se les sangra suministrando hierro y a otro se le sangra sin reponer el hierro sustraído. El volumen de sangre removida es equivalente en ambos grupos, siendo de 10ml/kg de peso. Este volumen es sin embargo, capaz de estimular la producción de reticulocitos en un 100%.

En la figura 10, se encuentran representadas las concentraciones de hemoglobina/100 ml para cada grupo. Es importante hacer notar, que el lote de conejos con hierro, al igual que el lote de conejos sin hierro, tienen un comportamiento similar hasta los primeros 12 días de sangrado diario. Entrando el treceavo día, se hace evidente una diferencia significativa, la cual consiste en una mayor concentración de hemoglobina en el grupo al cual no se le suministra hierro. En efecto, cuando se analiza estadísticamente la diferencia del promedio de los días 16 al 21, en ambos casos, ésta resulta significativa ($p=0.05$). En contraposición a esta diferencia, cuando se determina la cantidad de hierro

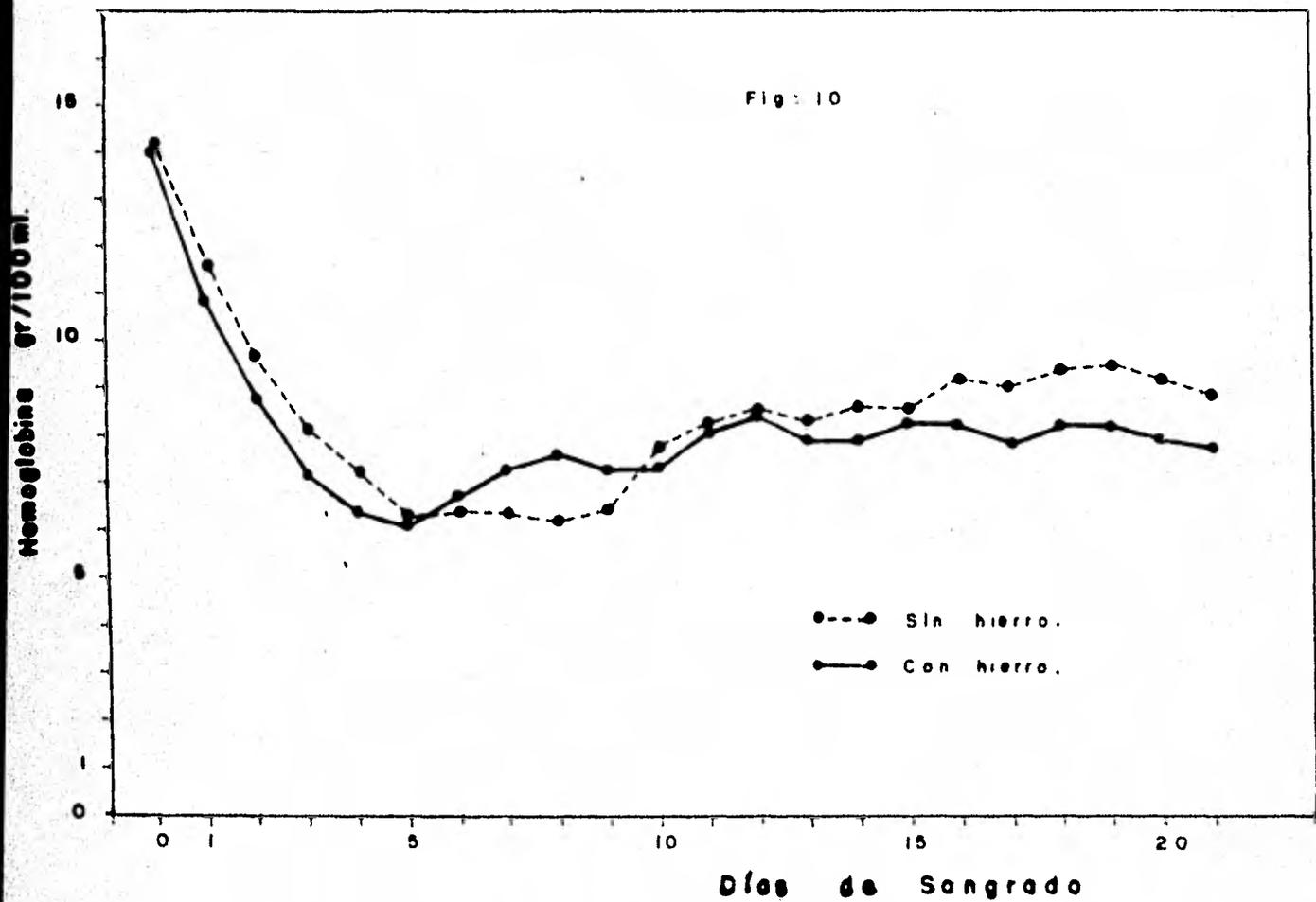


Fig. 10. - Variación de la concentración de hemoglobina durante la remoción de un volumen constante de sangre (10 ml/kg de peso). - Los valores se representan tanto para un grupo tratado con hierro como para otro no tratado. Las desviaciones estándar son despreciables.

removido en cada caso, figura 11, no se aprecia ninguna distinción entre ambos grupos, siendo análoga la cantidad de hierro extraído por día en los dos lotes distintos de conejos.

Por otra parte, en el desarrollo de este experimento se analizó el contenido de hierro sérico a lo largo del sangrado. Con este valor y la concentración de transferrina, fué factible calcular los porcentajes de saturación de esta última, asumiendo que en su mayor parte el hierro sérico se encuentra asociado a transferrina. En la siguiente figura (Fig. 12) puede observarse la cinética de esta glicoproteína a lo largo del sangrado, distinguiéndose durante los primeros 8 días antes de alcanzar el equilibrio, un incremento similar en ambos grupos, que es equivalente a su vez, a la dinámica observada en la figura 8, en la que se representa el promedio de la concentración de transferrina para los grupos de conejos a los que se les sustrae distintos volúmenes de sangre. No obstante, se observa una diferencia significativa ($p=0.05$) en este parámetro cuando se compara el promedio de la concentración en el equilibrio para ambos casos, siendo un 26% mayor la cantidad de transferrina circulante en el grupo al cual no se le suministra hierro, con respecto al cual se le aplica intraperitonealmente este último a lo largo del sangrado. Este punto es interesante, ya que cuando se compara el grado de saturación de la transferrina para ambos casos, puede observarse que sólo en el grupo al cual no se suministra hierro, el porcentaje de saturación no excede el 100%, siendo de un 64.4% en promedio durante los primeros 10 días, disminuyendo hasta un 52.6% una vez alcanzado el equilibrio. Sin em-

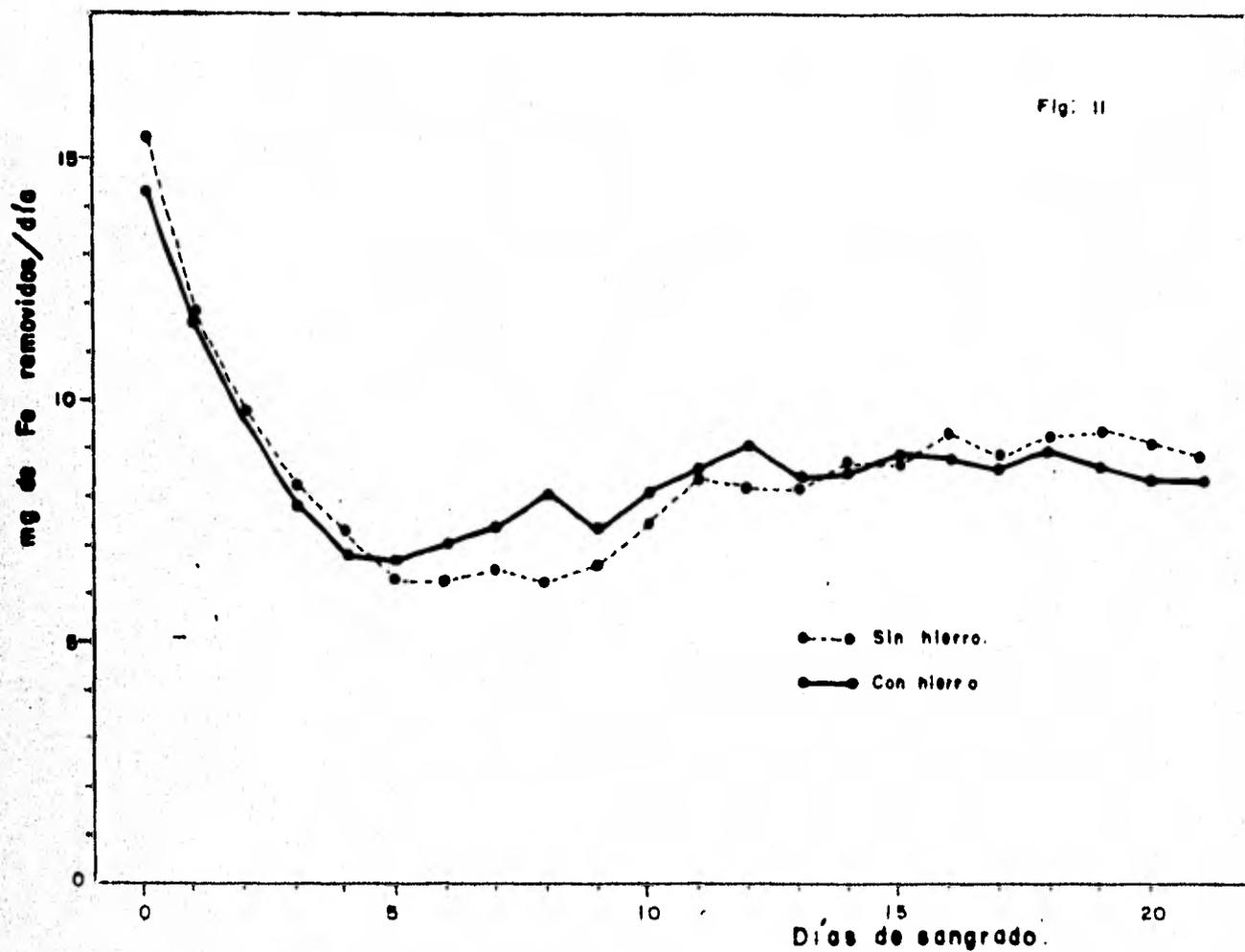


Fig. 11. - Hierro total extraído diariamente por la remoción de un volumen constante de sangre. Se representa la variación del hierro extraído durante el sangrado para dos grupos experimentales: uno tratado con hierro y un segundo no tratado.

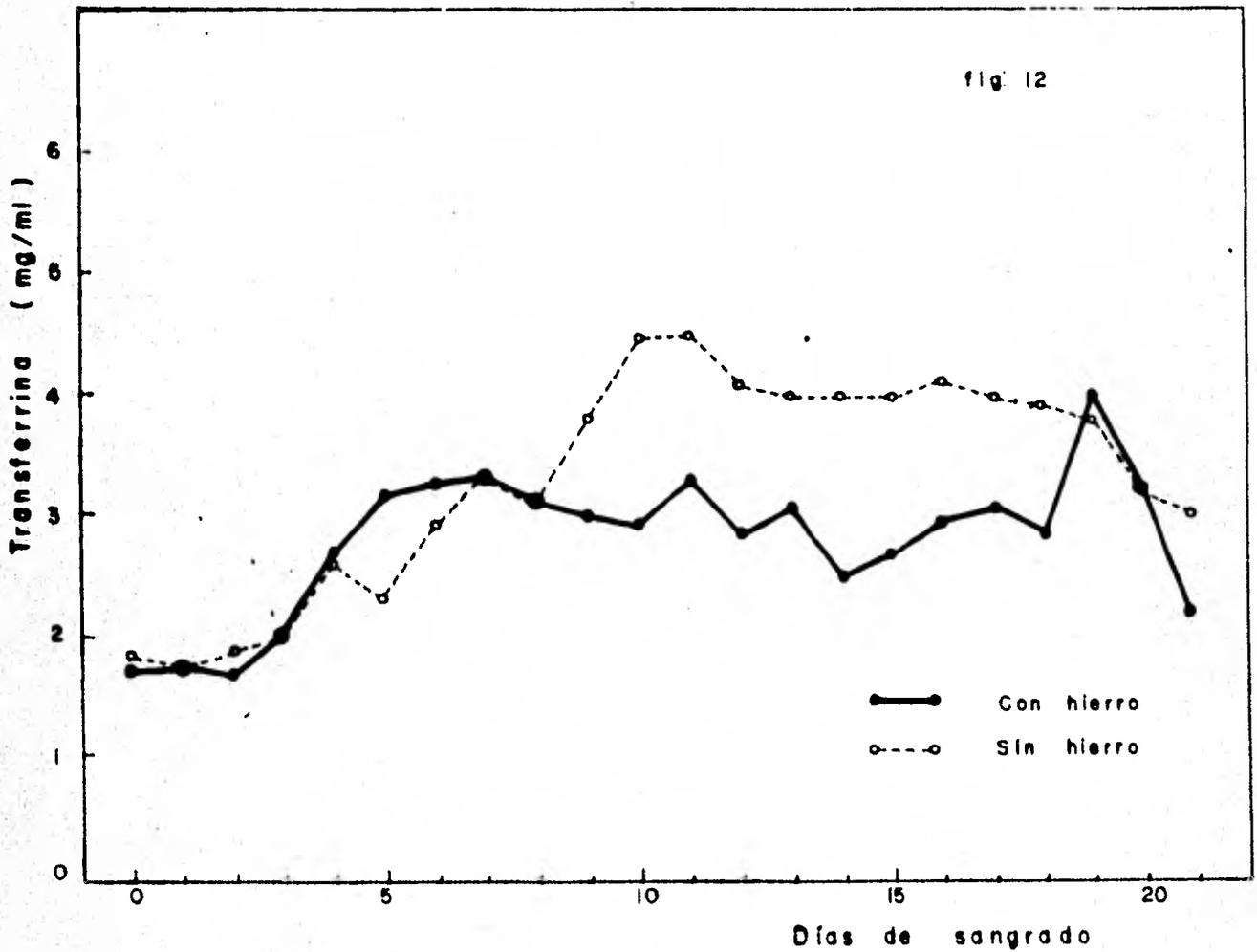


Fig. 12. - Efecto de la remoción de un volumen constante de sangre sobre la concentración de transferrina sérica, en conejos tratados y no tratados con hierro dextran.

bargo, analizando los porcentajes de saturación calculados a partir de la concentración de hierro y transferrina, en el grupo de conejos tratados con hierro, puede verse que en promedio, sólo después del décimo día de sangrado, el porcentaje de saturación es menor al 100%, estando por arriba de este valor durante los primeros días antes de alcanzarse el equilibrio. El porcentaje de saturación inicial en ambos casos, que refleja las condiciones normales, no excede el 100%, siendo en promedio de un 81.8%

En la tabla 1, se resume por día, la cantidad de hierro sérico y transferrina para cada grupo, así como las variaciones en cuanto al porcentaje de saturación de este último.

Tabla 1.- Porcentaje de saturación de la transferrina durante el proceso de anemia por sangrado en Conejos Nueva Zelanda Blancos. En la tabla se expresan tanto la concentración de transferrina como la de hierro en conejos tratados y no tratados con hierro.

Día de sangrado	Gpo. con HIERRO					Gpo. sin HIERRO				
	Transferrina mg/ml	σ	Hierro µg/ml	σ	% Saturación	Transferrina mg/ml	σ	Hierro µg/ml	σ	% Saturación
0	1.75	0.09	2.27	0.3	86.64	1.85	0.25	2.08	0.2	77
1	1.77	0.16	3.97	1.8	149.80	1.77	0.09	2.36	0.4	89
2	1.66	0.39	3.06	1.5	122.80	1.39	0.32	2.35	0.5	83.03
3	2.08	0.51	4.15	1.5	129.68	2.02	0.44	2.02	0.6	66.66
4	2.74	0.45	6.32	1.7	153.77	2.60	0.47	2.59	0.7	66.41
5	3.18	0.31	6.80	2.0	142.50	2.35	0.60	2.23	0.8	63.35
6	3.28	0.15	5.97	2.2	121.34	2.90	0.63	2.27	0.8	52.18
7	3.30	0.44	4.55	1.9	91.91	3.38	0.27	3.12	0.9	61.53
8	3.17	0.14	3.42	1.2	72.00	3.86	0.50	3.04	1.0	52.50
9	3.01	0.60	4.24	1.5	94.01	3.80	0.97	3.03	1.2	53.15
10	2.97	0.31	3.58	0.3	80.40	4.52	0.51	2.96	0.3	43.65
11	3.36	0.08	4.31	0.5	85.51	4.53	0.59	4.01	0.4	59.05
12	2.83	0.18	4.27	0.6	100.70	4.11	0.48	3.32	1.2	53.89
13	3.10	0.26	5.88	1.0	126.45	4.09	0.35	4.17	0.1	68.02
14	2.50	0.63	2.99	1.1	79.73	4.03	0.42	3.14	0.5	51.98
15	2.66	0.63	2.41	0.9	60.40	4.09	0.47	3.31	0.7	53.99
16	2.98	0.33	3.39	0.8	75.83	4.17	0.26	3.07	0.8	49.12
17	3.11	1.02	5.41	0.7	116.09	4.09	0.36	3.78	0.4	61.66
18	2.86	0.56	5.17	1.3	120.50	3.90	1.00	3.11	0.1	53.16
19	4.09	0.47	6.83	1.6	111.40	3.87	0.92	3.03	0.7	50.92
20	3.21	0.32	4.39	1.0	91.26	3.15	0.82	1.46	0.6	31.06
21	2.23	0.37	4.20	1.5	125.70	3.80	0.90	2.65	0.9	46.49

La figura 13, muestra la concentración de hierro sérico en ambos grupos. En cuanto a este parámetro, son notorias las diferencias encontradas entre el grupo tratado con hierro con respecto al no tratado. El grupo al cual se le suministra hierro, eleva rápidamente la concentración de este elemento en la circulación para posteriormente decrecer paulatinamente, estabilizándose momentáneamente del octavo al doceavo día, para luego volverse a incrementar bruscamente en los días subsecuentes, alterando dichos aumentos con disminuciones igualmente pronunciadas. Por el contrario, el grupo al cual no se le suministra hierro, presenta un aumento discreto y constante a lo largo del experimento, alcanzándose los valores más altos del décimo al décimo sexto días. Por otra parte, de los días 2 al 7, existe alrededor de 2 a 3 veces más hierro en el grupo al cual se le suministra este último intraperitonealmente, siendo menor la diferencia entre ambos grupos de los días 8 al 16, para volverse a disparar la diferencia entre estos del dieciseisavo al veinteavo día. Estas diferencias en cuanto a la concentración de hierro, implican, como ya se dijo anteriormente, una marcada diferencia en cuanto al grado de saturación de la transferrina sérica en ambos casos.

Finalmente, en este experimento se procedió a cuantificar el hierro no hemático de dos órganos que lo almacenan. Para ello se sacrificó un animal en condiciones normales, es decir, sin haber sido sangrado, extirpando tanto el hígado como el bazo. Por otra parte, se sacrificaron 5 conejos al finalizar el experimento, en el vigésimo primer

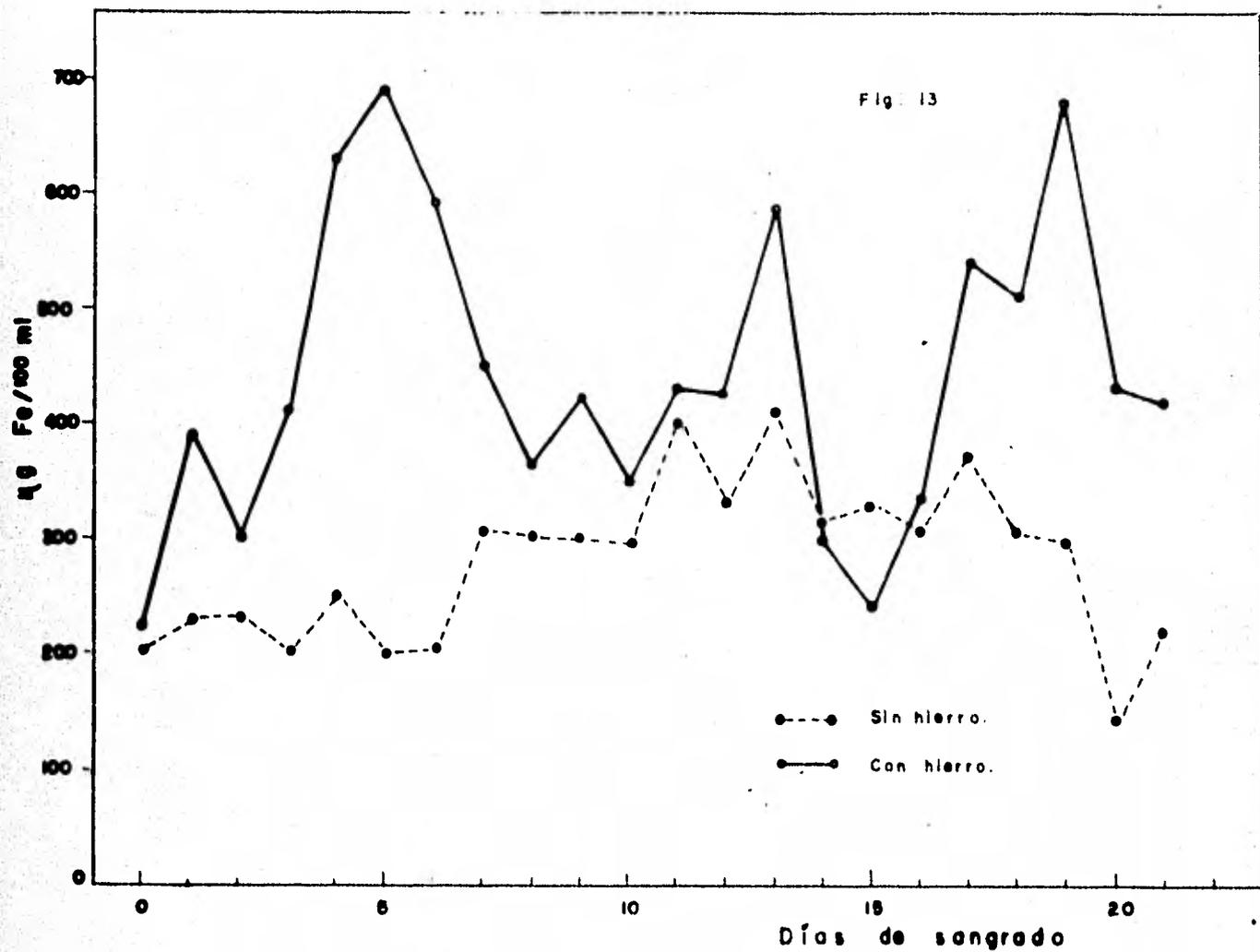


Fig. 13. - Efecto de la aplicación de hierro dextran durante el sangrado, en el contenido de hierro sérico.

día de sangrado. Dos de ellos habían sido tratados con hierro durante el experimento, los otros tres sólo fueron sangrados. La figura 14, muestra la cantidad de hierro por gramo de tejido fresco, tanto en hígado como en bazo de conejos normales y anémicos respectivamente. En cuanto a estos últimos, se representan por separado la cantidad de hierro por gramo de tejido fresco en los grupos tratados con hierro con respecto a los no tratados. Se expresa también la cantidad total de hierro en miligramos en el hígado y bazo de cada grupo.

Cuando se analiza el hierro remanente en hígado y bazo, después de finalizado el experimento, se pueden hacer las siguientes observaciones:

a) El hígado de conejos anémicos, tiene en promedio un 15% menos hierro que el normal; siendo de un 8.7% para los conejos anémicos tratados con hierro y de un 21.4% para los no tratados.

b) En relación al bazo, se observa que en condiciones de anemia, existe en promedio un 39.63% del hierro total almacenado en este órgano en condiciones normales. Un 50.87% persiste en los bazos de conejos anémicos tratados con hierro y tan sólo un 28.36% en el bazo de los conejos no tratados.

Ahora bien, con el objeto de resumir los resultados obtenidos en relación a la concentración de hierro hepático total, así como del hierro removido en cada grupo a lo largo del sangrado, en la tabla 2 se reportan de manera conjunta estos valores absolutos. En la misma tabla se anexa una columna en la cual se anota la diferencia en la concentración

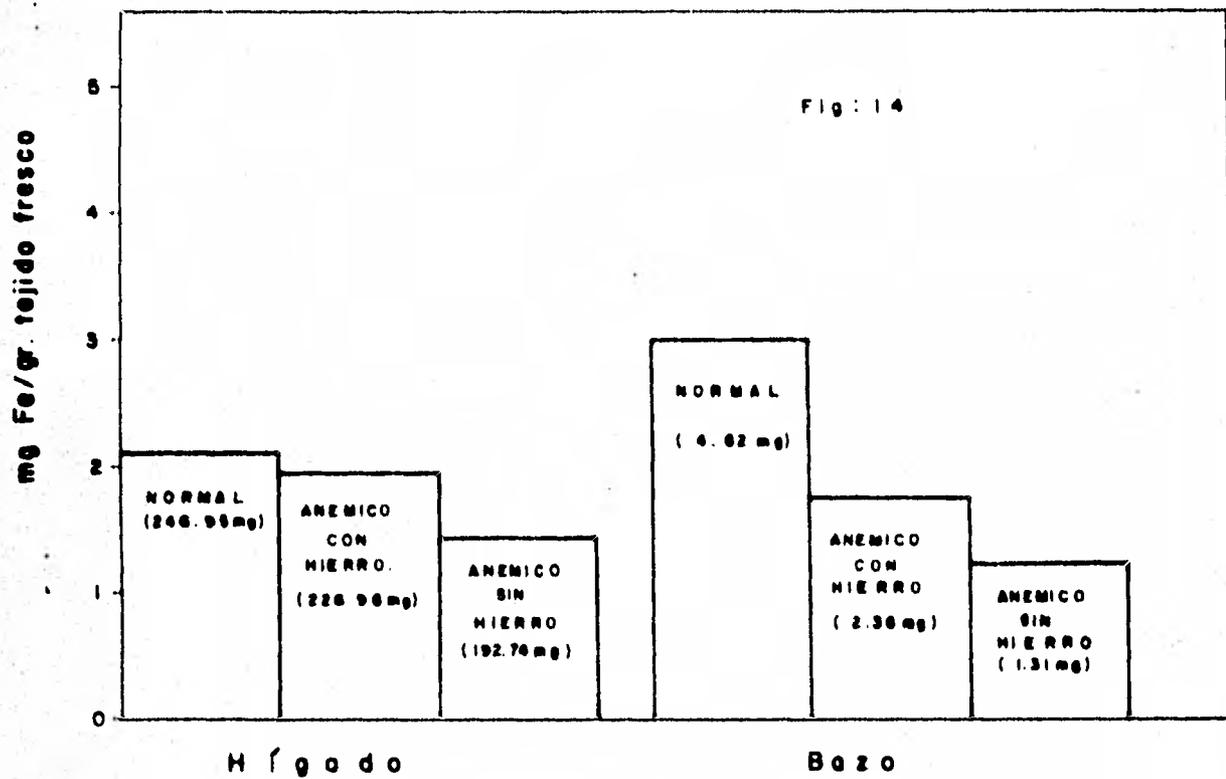


Fig. 14. - Contenido de hierro no hemínico en hígado y bazo de conejos normales y anémicos.

Tabla 2. - Contenido de hierro hepático después de 22 días de sangrado, en conejos tratados y no tratados con hierro. Se expresa también la diferencia de hierro hepático total de un conejo anémico (con y sin hierro) en relación a un conejo normal (sin sangrar) así como también el hierro total removido durante el sangrado. En el caso del grupo tratado con hierro se expresa en mg la cantidad total de hierro suministrado.

	Hierro total hepático en el equilibrio (mg)	Diferencia de hierro hepático con respecto al valor normal (mg)	Hierro total removido por sangrado (mg)	Hierro suministrado (mg)
Conejos tratados con hierro	226.98	19.95	192.19	201.7
Conejos no tratados con hierro	192.74	54.19	189.12	—

de hierro hepático normal, con respecto al contenido hepático observado en condiciones de anemia. Esta diferencia se expresa tanto para el grupo tratado con hierro como para el no tratado. En ambos casos, la diferencia observada, puede explicarse en función de los requerimientos de hierro de los conejos durante el estado de anemia inducido. Esto es debido a que en este último, se requiere sintetizar una mayor proporción de hemoglobina que en condiciones normales, equivalente cuando menos, a la cantidad removida de esta proteína por efecto del sangrado. En referencia a este punto, dado que la cantidad total de hierro removida a lo largo del sangrado, es equivalente a la concentración de hierro almacenado en el hígado de un conejo normal, la restitución de este elemento extraído, debe provenir de la dieta. Tomando en consideración la diferencia en contenido de hierro hepático en condiciones de anemia, así como la cantidad total de hierro extraído, puede estimarse la cantidad de este elemento incorporado en la alimentación diariamente. Este análisis indica, que mientras los conejos tratados con hierro, debieron haber incorporado por día, una cantidad de 7.82 mg de hierro, los no tratados debieron tomar 6.31 mg diariamente.

Tercer experimento . -

Efecto del suministro de transferrina en la eritropoyesis y el metabolismo de hierro en conejos anémicos,

Como resultado de los dos experimentos anteriores, en los cua-

les se aprecia un incremento significativo en la concentración de transferrina, concomitante a un aumento en la producción de reticulocitos, existía la duda del papel que ésta proteína podría tener en cuanto a la proliferación del tejido eritroide. Esta incertidumbre queda justificada, en función de que se conoce que la transferrina es la principal acarreadora de hierro hacia los centros hematopoyéticos. En el desarrollo final de este trabajo, se realizó un tercer experimento, el cual consistió en suministrar intravenosamente, una cantidad de transferrina sérica, equivalente a la concentración encontrada en el plasma de conejos anémicos, pero saturada al 80% con hierro. El objetivo principal de este experimento, era tratar de precisar si esta glicoproteína era factor limitante en la proliferación del tejido eritroide. Recuérdese en este sentido, que en el primer experimento realizado, se observaba que no obstante se sangraba un volumen mayor en el grupo experimental de 12ml/kg de peso en relación al de 9ml/kg de peso, la respuesta, en cuanto al número de reticulocitos producidos, era en ambos casos muy similar.

En la figura 15, se muestran los valores de transferrina sérica para dos grupos distintos de conejos. A cada grupo se le extrajo un volumen equivalente de sangre (10 ml/kg de peso). En el onceavo día, después de remover 1 ml. menos del volumen de sangre correspondiente, a un grupo se le inyecta intravenosamente transferrina pura de conejo y a un segundo, el mismo volumen de solución salina fisiológica. Una hora después de la inyección, se tomó una alícuota de 1 ml. para verificar el estado de los conejos. Cuando se determina la concentración de

transferrina, se aprecia un incremento de aproximadamente el doble en relación a los valores correspondientes a una hora antes de ser tomada la muestra.

Por el contrario, en los conejos inyectados con solución salina, disminuyen los niveles de transferrina, de una a dos veces aproximadamente. Veinticuatro horas después se restablece la concentración de transferrina en ambos grupos, teniendo valores muy cercanos a los normalmente alcanzados en el equilibrio después de inducida la anemia.

En cuanto a los niveles de hierro sérico figura 16, determinados en la misma alícuota, se aprecia una ligera disminución en ambos casos, siendo similares a los valores de ese mismo día antes de haber sido inyectados.

Volviendo a la figura 15, se observa que mientras ambos grupos antes del día 11, tienen una concentración de transferrina muy similar, 4 días después se dispara en más de un 100% la concentración de la misma, en el grupo al cual se le suministró transferrina intravenosamente. El grupo control mantiene, sin embargo, la concentración de transferrina hasta el último día de sangrado.

En lo que respecta a hierro, la figura 16 muestra que veinticuatro horas después del suministro de transferrina, se abaten los niveles de hierro dramáticamente, disminuyéndose alrededor de nueve veces con respecto al día anterior. Sin embargo en el grupo control, los niveles de hierro no se alteran de manera notoria. Por otra parte, en los días anteriores a la inyección de transferrina, los niveles de hierro en los

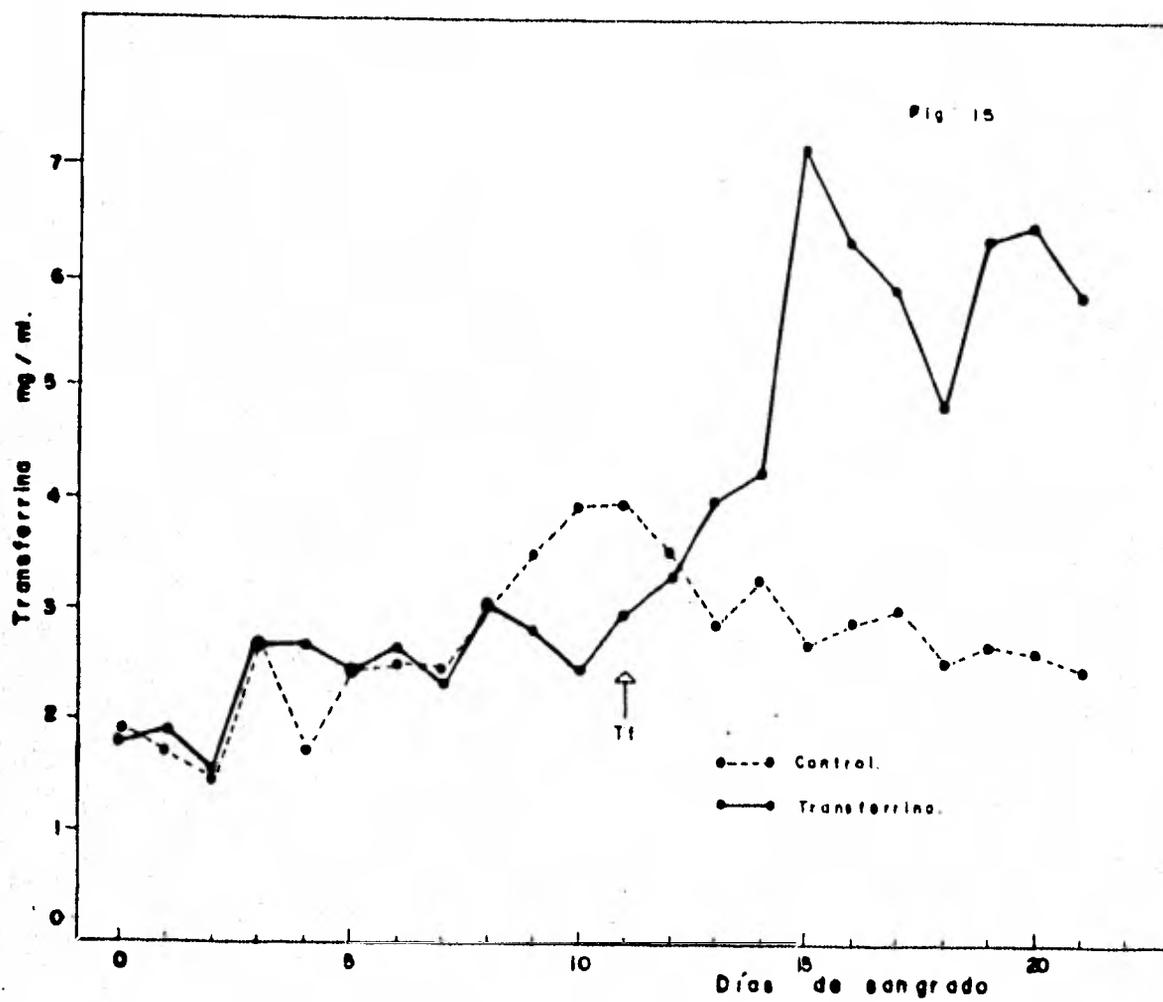


Fig. 15. - Efecto del suministro de transferrina en la concentración de transferrina endógena de conejos anémicos.

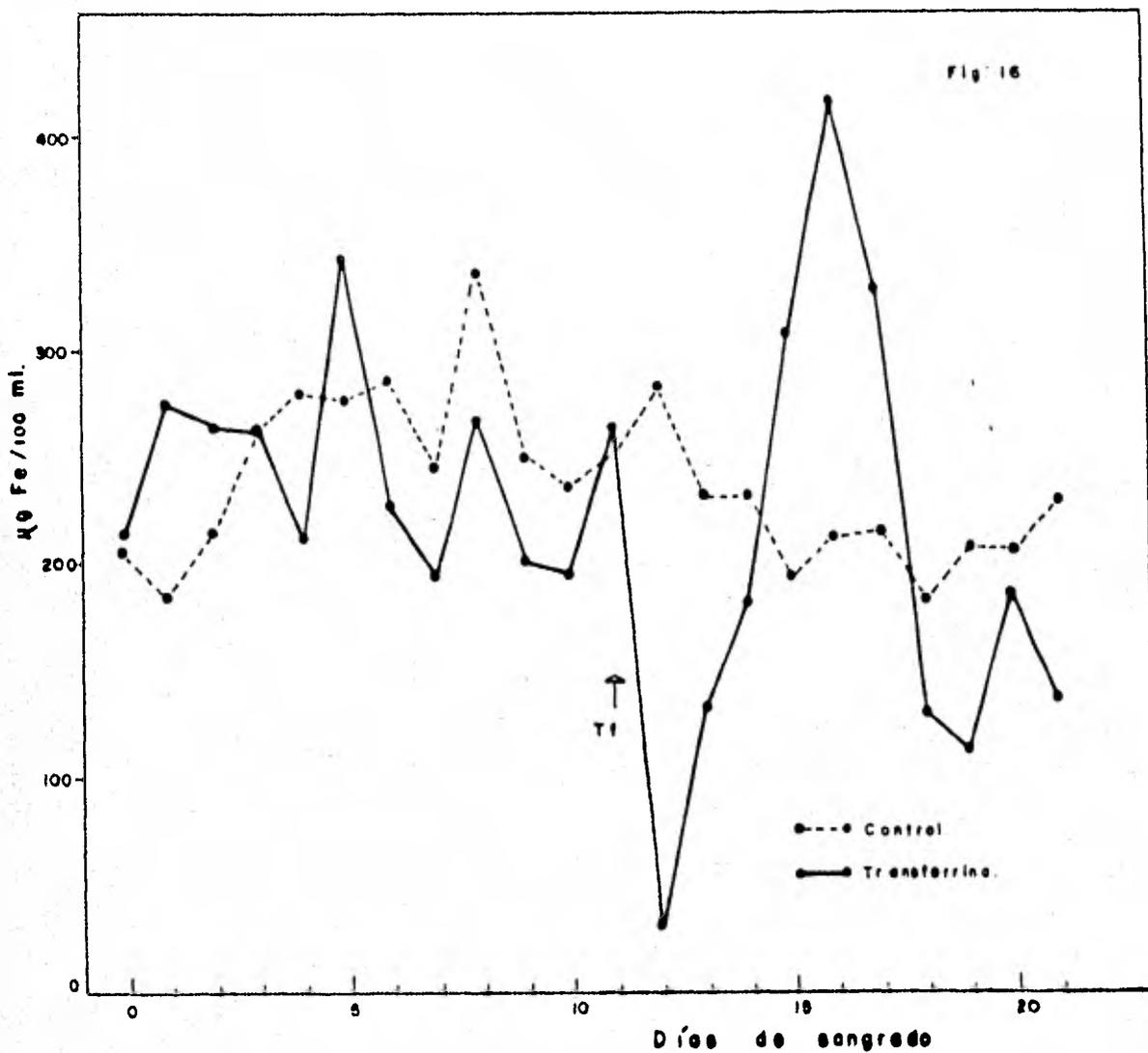


Fig. 16. - Alteración de los niveles de hierro sérico en conejos anémicos, después de la inyección de transferrina pura de conejo.

dos grupos, tienen una tendencia a incrementarse, siendo más claro dicho incremento en el grupo control.

En la tabla 3 se resumen las concentraciones de hierro y transferrina sérica, expresando por día, los porcentajes de saturación de ésta última. El porcentaje de saturación inicial promedio, fue en este caso del 74%. Promediando los porcentajes de saturación de ambos grupos hasta antes del día once y excluyendo el porcentaje inicial (normal) antes mencionado, tenemos que éste decrece a un 70%. El porcentaje de saturación decrece aún más en el equilibrio en el grupo control, siendo éste en promedio de un 50% a partir del onceavo día. En cuanto al grupo experimental, se hace notorio un decremento en el porcentaje de saturación al día siguiente del suministro de transferrina. En efecto, éste alcanza un mínimo de un 6%. No obstante este crítico descenso, un día después del mismo, el porcentaje de saturación es ahora de un 22.22%, alcanzando en los días subsecuentes un promedio del 24.33%.

Por último, en relación al número de reticulocitos circulantes, se puede apreciar, que en ambos grupos antes del día once, en el cual se inyecta transferrina, estas células se incrementan alrededor de 5 veces en relación a su valor normal. El valor promedio en el primer día de sangrado es de 0.226×10^{-6} reticulocitos Xmm^3 y se incrementan a una cifra de 1.16×10^{-6} reticulocitos Xmm^3 en el día once de sangrado. Este aumento se aprecia de manera constante a partir del séptimo día de sangrado en ambos grupos experimentales. Cuando se cuentan el número de estas células un día después de inyectada la transferrina,

Tabla 3. - Porcentaje de saturación de la transferrina durante el proceso de anemia por sangrado, antes y después de la inyección de transferrina pura de conejo. En la tabla se expresan tanto la concentración de transferrina como la de hierro en conejos no tratados y tratados con transferrina.

Día de sangrado	Gpo. CONTROL				% Saturación	Gpo. con TRANSFERRINA				
	Transferrina mg/ml	Hierro σ	Hierro $\mu\text{g/ml}$	σ		Transferrina mg/ml	Hierro σ	Hierro $\mu\text{g/ml}$	σ	% Saturación
0	1.98	0.38	2.06	0.5	70	1.84	0.38	2.15	0.2	77.89
1	1.74	0.49	1.83	0.6	70.11	1.93	0.42	2.76	0.6	95.50
2	1.49	0.72	2.17	0.5	97.30	1.58	0.72	2.64	0.5	90.30
3	2.73	0.55	2.62	0.6	64.05	2.76	0.72	2.61	0.6	63.04
4	1.76	1.00	2.81	0.7	96.00	2.76	1.0	2.13	0.7	51.44
5	2.44	1.10	2.78	1.0	75.95	2.51	0.90	3.42	1.1	90.95
6	2.46	1.09	2.87	0.5	77.70	2.68	1.01	2.29	0.5	54.28
7	2.41	0.67	2.47	1.0	68.42	2.37	0.65	1.97	1.1	55.49
8	3.02	0.51	3.39	0.5	74.83	3.07	0.51	2.69	0.5	58.47
9	3.58	0.15	2.52	1.0	46.92	2.83	0.15	2.03	1.0	47.87
10	3.80	0.90	2.39	1.1	41.92	2.46	1.10	1.97	1.2	53.38
11	3.94	0.71	2.52	1.0	42.63	2.97	1.22	2.65	1.0	59.55
12	3.59	0.43	2.87	0.7	53.34	3.29	0.15	0.30	0.7	6.08
13	2.82	0.63	2.32	0.3	54.84	4.02	1.10	1.34	0.3	22.22
14	3.28	0.24	2.32	0.7	47.15	4.27	0.75	1.82	0.7	28.4
15	2.77	0.14	1.94	0.9	46.74	7.27	1.60	3.08	1.1	28.25
16	2.89	0.48	2.13	0.8	49.19	6.35	0.85	4.18	1.0	43.9
17	2.93	0.52	2.18	0.9	49.65	5.90	1.05	3.28	0.9	37.17
18	2.57	0.53	1.83	0.8	47.53	4.80	1.40	1.30	0.9	17.95
19	2.77	0.65	2.08	0.9	54.02	6.39	0.77	1.12	0.1	11.69
20	2.60	0.44	2.08	1.2	53.33	6.45	0.49	1.85	0.7	19.54
21	2.46	0.55	2.31	1.1	62.60	5.84	0.75	1.38	0.6	15.75

se aprecia un descenso considerable, ya que éstas decrecen de 1.16×10^{-6} reticulocitos $\times \text{mm}^3$ a un valor de 0.568×10^{-6} reticulocitos $\times \text{mm}^3$.

A este respecto, la aplicación de solución salina fisiológica, en el grupo control, no causa una variación perceptible, ya que el valor para estas células, un día después es de 1.10×10^{-6} reticulocitos $\times \text{mm}^3$.

Retomando el comportamiento seguido por el grupo experimental, es importante mencionar que cuatro días después del suministro de transferrina, se vuelve a restablecer el número de reticulocitos observado en el equilibrio a partir del séptimo día de sangrado. Es interesante mencionar que este aumento en el número de reticulocitos no es progresivo, ya que de una cifra de $0.68 \times 10^{-6} \times \text{mm}^3$ en el día 14 de sangrado, en el día 15 han alcanzado un valor de 1.01×10^{-6} reticulocitos $\times \text{mm}^3$ mismo que se mantiene constante hasta el término del experimento en el día 21 de sangrado.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

En el desarrollo de este trabajo, se hizo uso de un sistema experimental, en el cual a través de una sangría crónica, se provoca un desequilibrio en algunas de las poblaciones celulares que componen el tejido sanguíneo (50, 52). Una de las poblaciones celulares afectadas es precisamente la de células rojas. Esta como ha sido destacado ya en otros trabajos, sufre un decremento pronunciado durante los primeros 6 días del sangrado, el cual se va haciendo cada vez menor, a medida que el organismo logra reponer el número de células rojas removidas.

En condiciones normales, el organismo debe remplazar un cierto número de células rojas que son eliminadas de la circulación por el sistema reticuloendotelial. En este caso, es evidente que el número de eritrocitos a reponer, debe ser menor que en las condiciones experimentales empleadas. Esto implica que las señales que provocan la producción de dichas estirpes celulares, deben estar alteradas en relación a las condiciones normales. En particular podríamos pensar en una amplificación de dichas señales, dado que el organismo presenta un déficit en cuanto al número de células rojas circulantes. Esto último se debe a que el conejo no sólo tiene que reponer las células que diariamente se destruyen, sino también aquellas que son removidas por efecto del sangrado. De hecho, una primera amplificación que se presenta en el animal experimental empleado, consiste en un aumento significativo en la producción de reticulocitos, la cual a su vez no es ilimitada, como lo

indican los resultados del primer experimento. A este respecto, debe recordarse que los conejos a los que se les remueve 9 y 12 ml/kg de peso, responden de manera análoga, tanto como en la concentración de hemoglobina, como en el número de reticulocitos que producen.

Una segunda alteración en el curso de la anemia inducida, se refleja en el cambio notorio de los niveles de transferrina plasmática. Este aumento presenta sin embargo, características peculiares. La primera de ellas es que se incrementa de manera significativa y aproximadamente constante a partir del cuarto día de sangrado, en los tres experimentos realizados, en los cuales se induce un estado anémico en distintas condiciones. La segunda es que el aumento producido durante la anemia, no es proporcional al grado de severidad de ésta última, ya que como lo indican los resultados del primer experimento, no importando el volumen de sangre removido, la transferrina se eleva de una manera equivalente tanto en un grupo de conejos a los que se le extraen 3 ml/kg de peso como a los que se les remueven 12 ml/kg de peso. En cuanto a este punto, habría que enfatizar que los niveles de transferrina medidos en un volumen constante de plasma, no indican de manera directa cómo está la biosíntesis de esta proteína.

Para conocer de una forma aproximada el grado de biosíntesis de este compuesto en cada caso, se tendrían que tomar en cuenta varios factores. Se debería conocer tanto la vida media de la transferrina de conejo anémico, como la cantidad total de la misma en todo el volumen sanguíneo del organismo. Otro punto a considerar, en cuanto a éste

problema, es la cantidad total de transferrina removida en cada caso. En efecto, el grupo de 3 ml/kg de peso, no tiene que reponer la cantidad de transferrina que pierde el grupo de 12 ml/kg de peso, tan sólo por efecto del sangrado. Finalmente, debe conocerse la cantidad de transferrina remanente en algunos órganos como el hígado. Desafortunadamente por el momento, no cuento con ningún dato experimental en relación a los valores antes mencionados.

Antes de continuar la descripción en cuanto al comportamiento de la transferrina en las diferentes condiciones experimentales, habría que mencionar que aunque esta proteína se incrementa significativamente en el curso de la anemia, la cantidad total de proteína sérica no se ve drásticamente afectada, ya que en términos generales esta se mantiene constante (Fig. 6) aún cuando la transferrina es una de las proteínas más abundantes del plasma junto con la albúmina.

Por otra parte, retomando el comportamiento de la transferrina durante el curso del segundo experimento, podemos notar que independientemente del suministro de hierro intraperitoneal, ésta se incrementa de manera análoga al grupo al cual no se le ha suministrado hierro. En efecto, antes de alcanzarse el equilibrio, los dos grupos presentan un comportamiento similar, existiendo una mayor concentración de transferrina en el grupo sin hierro una vez que el organismo mantiene estables los niveles de esta proteína (Fig. 12).

Los resultados obtenidos en este experimento son interesantes por varias razones. En primer lugar, el hecho de que la transferrina

se incrementa de manera análoga durante los primeros 9 días de sangrado, implica la existencia de un estímulo común en todos los grupos de conejos. En la figura 10 se observa un decremento similar en la concentración de hemoglobina, el cual se acentúa en ambos casos entre los días quinto y sexto aproximadamente.

Dado que la concentración de hemoglobina es importante para mantener la oxigenación de los tejidos, una disminución de ésta, debe provocar muy probablemente un estado de hipoxia, el cual sería equivalente para el grupo tratado con hierro en comparación al no tratado. De acuerdo con Morgan ⁽⁵³⁾, una variación en la tensión parcial de oxígeno en los tejidos, conlleva a una elevación en los niveles de transferrina plasmática. En cuanto a este punto, podemos suponer que un factor común en todos los experimentos realizados, es la inducción de un estado de hipoxia al disminuir en todos los casos la concentración de hemoglobina, de ahí que se incrementa la concentración de transferrina circulante de una forma sistemática a partir de los mismos días en los que son críticos los niveles de hemoglobina (días 6 y 7). Este hecho hace suponer que la elevación de transferrina, está asociada con la movilización de hierro a médula ósea para la síntesis de hemoglobina, siendo un descenso en la presión parcial de oxígeno tisular un primer factor que esté mediando un probable incremento en la biosíntesis de transferrina. No obstante, para el mismo Morgan y Brackendrige ⁽⁵⁴⁾, un incremento en la concentración de los niveles de hierro plasmático, es el causante de un aumento en la biosíntesis de transferrina por células parenquimatosas

del hígado de ratón. Desde este punto de vista un exceso de hierro plasmático, más que un déficit del mismo, sería el causante de un aumento en la biosíntesis de transferrina. De las figuras 12 y 13 respectivamente, se puede apreciar que no obstante los niveles de hierro sérico son más altos en el grupo tratado con hierro, con respecto al no tratado (de los días 4 al 6 en la gráfica), no se aprecia consecuentemente una mayor concentración de transferrina sérica en el grupo tratado con hierro; aunque este hecho no nos hable directamente de su biosíntesis, pienso que el incremento en la transferrina sérica es reflejo, en cierta medida, de la velocidad de biosíntesis de la misma, por lo que un aumento de los niveles de hierro sérico en este experimento, no pienso que esté relacionado con un incremento en la biosíntesis de transferrina. Sin embargo lo que sí es notorio entre los dos grupos del segundo experimento, es una diferencia en cuanto al porcentaje de saturación de la transferrina en cada uno de ellos. En efecto, mientras el porcentaje de saturación en los conejos suplementados con hierro excede el 100% o se encuentra siempre muy cercano a este valor, el porcentaje de saturación en el grupo no tratado con hierro es menor al 100%, alcanzando valores hasta de un 52.6% en los días en que la concentración de transferrina permanece constante. Algunos autores (55, 56), consideran que el porcentaje de saturación de la transferrina, regula el curso del hierro que ésta acarrea, es decir, si el hierro será destinado en su mayor parte a la producción de células rojas, o si será almacenado. De acuerdo a esta hipótesis, cuando la transferrina está muy saturada, el hierro que ésta acarrea es alma-

cenado en el hígado principalmente, destinándose una menor proporción para la síntesis de hemoglobina. En el caso contrario, cuando la transferrina está menos saturada, el hierro que ésta puede aportar es utilizado principalmente en la síntesis de hemoglobina.

Ahora bien, otra de las diferencias que pueden apreciarse en cuanto al comportamiento del grupo tratado con hierro con respecto al no tratado, está en relación al contenido de hierro hepático no hemínico en ambos casos. Cuando se compara la cantidad de este elemento en el hígado de conejos con hierro con respecto al de los conejos no suplementados con el mismo, se aprecia una menor concentración de hierro en este último, tal y como lo indican los resultados expresados en la figura 14. En resumen, de las evidencias experimentales aportadas en este trabajo, podemos concluir que los conejos a los cuales se les suministra hierro, presentan un incremento menor en la concentración de transferrina en el equilibrio (teniendo un porcentaje de saturación más alto con respecto a los conejos no suplementados con hierro) y un mayor contenido de hierro hepático.

Antes de hacer una discusión general de éstos resultados, mencionemos algunas características encontradas en otros sistemas, en relación al metabolismo de la transferrina. A este respecto R. S Lane ⁽⁵⁷⁾ y Cromwell ⁽⁵⁸⁾ han encontrado que al parecer, los cambios acentuados en la concentración de transferrina en el hígado de rata, originan un aumento en el catabolismo de la misma. Sin embargo este proceso puede revertirse en el caso de que exista un incremento rápido en el contenido

de transferrina en hígado, ya que esta señal promueve ahora la síntesis de transferrina más que su degradación, elevando a su vez la concentración de transferrina plasmática. Cromwell ⁽⁵⁸⁾ en este sentido, observa que en condiciones de una deficiencia crónica de hierro, el nivel de transferrina plasmática es mayor, disminuyendo su velocidad de degradación a nivel hepático.

Una explicación de los resultados antes mencionados, acordes con las evidencias encontradas en la literatura puede resumirse entonces de la manera siguiente: En ambos casos, tanto en el grupo con hierro como en el grupo sin hierro, al reducirse los niveles de hemoglobina, por efecto del sangrado (Fig. 10), se provoca muy probablemente un estado de hipoxia. Una primera respuesta ante esta falta de oxigenación, traería consigo la elevación de los niveles de transferrina plasmática. Esta última al encontrarse más saturada en el grupo tratado con hierro, aportaría una mayor proporción de este elemento al hígado, en comparación al grupo no tratado. A su vez esto implicaría, según Lane ⁽⁵⁷⁾, un mayor catabolismo de la transferrina de conejos a los cuales se les suministra hierro. Por el contrario, en el caso de los conejos no tratados, la transferrina acarrearía una mayor proporción de hierro a médula ósea roja, al encontrarse en un porcentaje de saturación incluso menor al normal. Esta hipótesis podría no ser cierta, pero pienso que los datos experimentales la apoyan en cierta medida, aunque de una manera indirecta. Así por ejemplo, la hipótesis anterior supone que la proporción de hierro almacenado en el hígado de los conejos no tratados debe ser menor

en relación a los tratados con hierro, siendo a su vez mayor la velocidad de degradación de la transferrina en este último caso. Con relación a lo anterior, los resultados obtenidos indican efectivamente que en el equilibrio, el grupo tratado con hierro presenta una mayor cantidad de este elemento almacenado en hígado, pero a su vez una concentración significativamente menor de transferrina plasmática, en relación al grupo no tratado. Por otro lado, si pensamos que en el grupo no tratado con hierro, la transferrina al disminuir su porcentaje de saturación, aporta preferencialmente su hierro a médula ósea, deberíamos esperar una diferencia en cuanto al contenido de hemoglobina en relación al grupo tratado con hierro. A este respecto, cuando se analiza la concentración de hemoglobina en el equilibrio (Fig. 10), se observa un nivel significativamente más alto de esta proteína en los conejos no tratados con hierro. Lo anterior no implica desde luego, que el hierro no sea indispensable para la síntesis de hemoglobina. Debe recordarse, en cuanto a este punto, que todos los lotes de conejos fueron alimentados ad libitum con purina, la cual contiene aproximadamente 125 mg de hierro por gramo de purina, cantidad de hierro suficiente como para cubrir las necesidades diarias de este elemento, aún en condiciones de anemia. En función del hierro extraído en forma de hemoglobina y considerando la cantidad de hierro almacenado en hígado, por ser el centro principal de reservas de este elemento, fué factible estimar en este trabajo, la cantidad de hierro que debería de incorporarse diariamente a través de la dieta. Los valores calculados fueron 7.82 mg de hierro por día para el grupo trata-

do con hierro y 6.31 mg de hierro por día para el no tratado, los cuales son muy cercanos entre sí. Esto indica que muy probablemente, el hecho de que existan niveles de hierro sérico más altos en los conejos tratados con hierro, está en función del suministrado intraperitonealmente y no por una mayor velocidad de absorción del hierro a nivel intestinal, proveniente de la alimentación.

Tomando en consideración el contenido de hierro en el bazo de cada uno de los grupos de conejos anteriormente citados, nos encontramos que este órgano pierde una cantidad importante de hierro por efecto de la anemia provocada. La disminución de hierro en este órgano, puede deberse a dos razones principales. La primera consiste en que durante la anemia este órgano, que almacena hierro, pueda cederlo paulatinamente a lo largo del sangrado, para su utilización en médula ósea roja. En este sentido, como la disponibilidad de hierro es menor en el grupo no tratado con hierro, podríamos explicar el porqué de una disminución de hierro en el bazo de estos conejos en relación al grupo con hierro. Sin embargo, aunque el hígado y el bazo forman parte tanto de la poza metabólica de hierro lábil como fijo⁽⁴⁰⁾, el hierro almacenado por este último órgano, es mucho menor en relación al hierro hepático. Ciertamente, si el hierro perdido por el sangrado, fuera repuesto por el hierro almacenado en bazo, tan solo una única extracción de un volumen de sangre equivalente a 10 ml/kg de peso, agotaría la cantidad total de hierro almacenado en este órgano, por lo que si éste aporta hierro para su utilización en la síntesis de hemoglobina, debe ser realmente muy poca su aporta-

ción. Una segunda razón que explica el descenso tan acentuado de hierro en el bazo, está en relación al papel que éste juega dentro del recambio de células rojas. Es en el bazo, en donde se destruye periódicamente una cierta proporción de células rojas que entran en un proceso de envejecimiento, siendo almacenados en el mismo, algunos de los subproductos originados por la destrucción de estas células ^(40, 55). Dentro de los desechos que almacena el bazo, se encuentra justamente el hierro que proviene principalmente de la degradación de la hemoglobina. Ahora bien, durante el sangrado se remueve una cantidad importante de células rojas diariamente, que incluyen tanto formas jóvenes como viejas. El mismo sangrado trae como consecuencia un aumento en la producción de reticulocitos, de tal manera que estas poblaciones jóvenes en un estado de anemia, son más abundantes que las formas maduras, en relación a las condiciones normales. Lo anterior trae como consecuencia, que la proporción de células rojas destruidas en el bazo sea entonces menor, existiendo paralelamente una disminución en la cantidad de hierro almacenado.

Finalmente, retomando los resultados obtenidos en el primer experimento, se había mencionado la existencia de un límite en cuanto a la capacidad de respuesta en la proliferación de reticulocitos inducida por sangrado. Este límite puede deberse a dos razones, la primera de ellas estaría en función de la capacidad de división de las células precursoras de este tipo celular, y la segunda en un máximo de respuesta en cuanto a la síntesis de proteína tales como la hemoglobina, que determinan la

la maduración de las estirpes celulares que anteceden al reticulocito. En la figura 9, correspondiente al primer experimento, se representa el grado de proporcionalidad entre el número de reticulocitos producidos en el equilibrio y la cantidad de transferrina, cuando se extraen diferentes volúmenes de sangre. En esta gráfica se observa que cuando se sangra un máximo de 12 ml/kg de peso, la relación reticulocito/transferrina es equivalente al grupo al cual sólo se le extraían 9 ml/kg de peso. Si consideramos que la transferrina es la proteína acarreadora de hierro a los centros hematopoyéticos y este último es indispensable para la síntesis de hemoglobina, el hecho de que la relación reticulocito/transferrina sea muy semejante en los grupos en los que se alcanza el máximo de estimulación en la producción de células rojas, fué interpretado en función de que probablemente un factor limitante para una mayor proliferación, era la transferrina.

Cuando transferrina pura de conejo (saturada al 80% con Fe) fué inyectada intravenosamente en conejos anémicos, no suplementados con hierro, se observaron tres fenómenos importantes:

a) 24 horas después de la inyección, disminuyeron los niveles de hierro bruscamente. La transferrina circulante, se encuentra alrededor de un 6% saturada.

b) Concomitantemente, en el mismo lapso, decreció el número de reticulocitos de una forma igualmente dramática, manteniéndose dos días por debajo de los valores alcanzados en el equilibrio durante el sangrado.

c) A partir del cuarto día después de la inyección de transferrina, esta se elevó en más de un 100% en relación a la concentración alcanzada en el equilibrio.

De los tres puntos anteriores, se puede concluir, que cuando se duplica experimentalmente la concentración de transferrina sérica, de alguna manera se modifica el metabolismo de ésta proteína de tal suerte que se incrementa muy probablemente su biosíntesis. Por otra parte, en función de que éste estímulo en la producción de transferrina, sobrepasa los valores máximos alcanzados de este compuesto cuando se estimula a los conejos por sangrado, no puede pensarse que esta glicoproteína sea un factor limitante en la eritropoyésis. Se puede concluir también, que un incremento repentino en la concentración de transferrina, bloquea, cuando menos durante 24 horas, el transporte de hierro en la circulación, ya que sólo después de este lapso, el hierro sérico comienza a restablecer los valores observados antes del suministro de esta proteína. Por último puede concluirse, que al descender los niveles de hierro en la circulación, se provoca un bloqueo en la producción de células rojas.

Una explicación a este comportamiento, podría hacerse en relación a lo observado por Lane en ratas. En este sentido, ya se había hecho mención que él detectaba una mayor biosíntesis de transferrina, cuando se sucedían cambios rápidos en la concentración de la misma a nivel hepático. Por lo anterior, podría suponerse, que en este último experimento al inyectar transferrina saturada en un 80%, la mayor

parte de ésta debió transportar el hierro principalmente hasta el hígado, causando un descenso en el nivel de hierro sérico. A su vez, al incrementarse bruscamente los niveles de transferrina en este órgano, se provocaron cambios en el metabolismo de esta proteína, induciéndose la biosíntesis de la misma.

Aunque los resultados del tercer experimento realizado, no aportan una idea clara del papel de la transferrina en el curso de la eritropoyesis, pienso que esta glicoproteína se encuentra estrechamente asociada a este proceso, ya que el hierro que transporte a médula ósea roja, puede ser directamente utilizado en la síntesis del grupo hemo, mismo que según algunos autores antes citados, regula la traducción del mRNA de globina.

En lo particular, pienso que habría que efectuar experimentos adicionales, en los cuales se varíe la concentración y el porcentaje de saturación de la transferrina suministrada a conejos anémicos. Esto es debido a que al parecer, la transferrina presenta características muy bien definidas que regulan su metabolismo, tales como su concentración plasmática y su porcentaje de saturación.

Para otros autores como Gordon y Koj⁽⁵⁹⁾, la transferrina al igual que otras glicoproteínas plasmáticas, pertenece al grupo de proteínas del sistema denominado como "reactantes de fase aguda" (APRs). En este sistema se incluyen todas aquellas glicoproteínas del suero cuya biosíntesis a nivel hepático se incrementa después de que el organismo sufre distintos tipos de traumas, tales como el de una interven-

ción quirúrgica, una lesión cutánea, alguna inflamación, etc. En lo particular Gordon y Koj reportan que después de una hepatectomía, se incrementa la biosíntesis de transferrina aproximadamente de un 60% a un 70%.

Otros autores como Crockson, Werner y Odenthal ⁽⁶⁰⁾, demuestran que después de una intervención quirúrgica no aumentan los niveles de transferrina sérica, no observando tampoco una mayor biosíntesis de la misma a nivel hepático. Discrepancias como la anterior, llevan a A. Koj ⁽⁶⁰⁾ a eliminar tentativamente a la transferrina como una proteína del sistema APRs. En lo particular pienso que la elevación en la concentración de transferrina plasmática en los conejos anémicos, no es debido al trauma cutáneo que se les ocasiona diariamente por la punción cardiaca, dado que si ésto fuese motivo de una elevación en la concentración de transferrina, dicha elevación debería de sucitarse desde el primer día en que se ocasiona dicho estado traumático.

RESUMEN

En una serie de tres experimentos realizados en conejos Nueva Zelanda blancos, se observa que después de inducir un estado de anemia por sangrado, se elevan de manera significativa los niveles de transferrina circulante, sin alterar notoriamente, la concentración de proteína sérica total. La elevación de transferrina no es sin embargo, proporcional al volumen de sangre removida.

En el presente trabajo se sugiere que el aumento de esta glicoproteína puede estar relacionada con una deficiencia en la oxigenación tisular, ya que la concentración de hemoglobina/100 ml de sangre, decrece conforme avanza el proceso de anemia. No obstante, no se dan evidencias directas que apoyen dicha hipótesis. Por otra parte, asociada a la elevación en la concentración de transferrina, se incrementan los niveles de hierro sérico, siendo mayor el aumento en los conejos suplementados con hierro, en comparación a los no tratados. Aún cuando el hierro sérico se incrementa, el porcentaje de saturación de la transferrina, disminuye de un 80% a un 60% aproximadamente, en conejos a los cuales no se les suministra hierro. Por el contrario, en conejos tratados con hierro, la transferrina siempre está cercana al 100% de saturación.

Cuando se analiza la concentración de hierro no hemínico en hígado y bazo de conejos anémicos, se aprecia en ambos casos, un descenso de este elemento en comparación al hierro no hemínico de un hígado y bazo normales. En general la disminución de hierro en el hígado de conejos anémicos es de un 28%, mientras la del bazo llega a ser has-

ta de un 60%. En relación a este punto, el hierro almacenado en el hígado de conejos anémicos tratados con hierro, es mayor al de los conejos no tratados, siendo inclusive muy cercano al contenido normal. Una explicación a esta diferencia se sugiere con base en el porcentaje de saturación de la transferrina en cada grupo. Por su parte, la disminución de hierro en bazo se asocia en ambos casos, con un menor recambio de células rojas.

Finalmente, al duplicar experimentalmente la concentración de transferrina sérica, se observa un decremento tanto en la producción de reticulocitos como en los niveles de hierro sérico. A su vez, se observan cambios en el metabolismo de la transferrina. A este respecto, se sugiere que los cambios repentinos en los niveles de transferrina plasmática, inducen su biosíntesis.

Se considera también que el comportamiento de la transferrina en los experimentos realizados, no corresponde al de una proteína del sistema APRs.

BIBLIOGRAFIA

1. Till, J. E., E. A. Mc. Culloch. 1964. A stochastic model of stem cell proliferation, based on the growth of spleen colony-forming - cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 51:29.
2. Curry J. L., Trentin, J. J. 1967. Hemopoietic spleen colony studies. II. Erythropoiesis. J. Exp. Med. 125: 703-719.
3. Maximow A. A. 1924 Relation of blood cells to connective tissues - and endothelium. Physiol. Rev. 4: 533-563.
4. Trentin, J., Wolf V. 1967. Antibody production by mice repopulated with limited numbers of clones of Lymphoid cell precursors. The - journal of Immunology Vol. 98: 326.
5. Metcalf, D. 1970. Studies on colony formation in vitro by mouse bone marrow cells. II Action of Colony-Stimulating factor. J. Cell Physiol. 76: 89-99.
6. Metcalf, D. 1971. Acute antigen-induced elevation of Serum Colony - Stimulating factor (CSF) levels. Immunology 21: 427-432.
7. Metcalf, D. Hematopoietic Cells. En North Holland Publishing Company. Frontiers of Biology. Netherlands 1971.
8. Boggs, D.R., Marsh, J. C., Chevenick, P.A. 1968. Neutrofil releasing activity in plasma of Normal Human Subjects Injected with Endotoxin. Proc. Soc. Exp. Bio. Med. 127: 689-693.
9. Kurland, J.I. Bockman, R.S., 1978. Limitation of excessive myelopoiesis by the intrinsic modulation of macrophage derived - Prostaglandina E. Science 199: 552-555.
10. Broxmeyer, H.E. 1978. Identification of Lactoferrin as the granulocyte derived inhibitor of colony stimulating activity (CSA) production. J. Exp. Med. 148: 1052.
11. Carnot, P., and Deflandre C. 1906. Sur l'activité hémopoïétique - du serum. C.R. Acad. Sc. (Paris) 143: 384.
12. Bonsdorff, E., and Jalavisto 1948. Humoral Mechanism in anoxic erythrocytosis. Acta Physiol. Scand. 16: 150.
13. Rosse, W.F., Berry, R.J. 1963. Some Molecular Characteristics of Erythropoietin from different sources determined by inactivation by ionizing radiation. J. Clin. Invest. 42: 124.

14. Goldwasser E. 1976. Erythropoietin, Blut. 33: 135-140.
15. Contrera, J. F. Gordon, A.S. 1968. The renal erythropoietic - Factor I Studies on its purification and properties. Ann. N.Y. Acad. Sci. 149: 114.
16. Kazal. L.A., Erslev, A.J., 1970. Separation of renal inhibitor to human erythropoietin. Fed. Proc. 29: 628.
17. Fisher, J.W., Langston, J.W. 1967. Influence of hypoxemia and cobalt on erythropoietin production in the isolated perfused dog kidney. Blood 29: 114-125.
18. Pavlovic, Kentera V., Hall, D.P., 1967. Unilateral renal hipoxia and production of erythropoietin. J. Lab. Cli. Med. 65: 577.
19. Borsook, H., Ratner, K. Ta Hrie B., 1959. Ann. N.Y. Acad. Sc. 77: 725-735.
20. Miura, Y., Takaku, I., Nakao, K. 1967. In vitro effect of erythropoietin on the spleen of polycythemic mouse. II Radiosensitivity of Stem cells. Blood. 29: 852.
21. Miura, Y., Mizoguchi, H. Takaku F. Limited exposure to erythropoietin and Actinomycin D. Blood 1968. 31: 433.
22. Nakao, K. Takaku F., Fujioka S., Sassa, S. 1966. The effect of - erythropoietin on hematopoietic organs of the polycythemic mouse. Blood 27: 537.
23. Stephenson J. Rl, Axelrad A. A. 1971. Separation of erythropoietin sensitive cells from hemopoietic spleen colony-forming stem cells of mouse fetal liver by unit gravity sedimentation. Blood. 37: 417.
24. Pavlov A.D. 1970. Effect of erythropoietin on synthesis of various classes of Ribonucleic acids in rabbit bone marrow. En: The regulation of erythropoiesis and Haemoglobin synthesis eds. Tomas - Travnicek y Jan Nevwirt. Universita Karlova, Praha. p 276.
25. Paul John. 1976. Haemoglobin synthesis and cell diferentiation. Br. Med. Bull. 32: 277.
26. Peschle , M.D. 1980. Erythropoiesis. Ann. Rev. Med, 31: 303-314.
27. Singer, J.W. Adamson, J.W. 1976. Steroids and hematopoiesis. - III. The response of granulocitic and erythroid colony forming cells to steroids of different classes. Blood, 48: 855-864.

28. Golde, D.W., Bersh, N. L. 1977. Growth hormone; species-specific stimulation of Erythropoiesis in vitro. Science 196: 1112-1113.
29. Nicholand D., Hoffman, R. 1978. Potentiation of human erythropoiesis in vitro by thyroid hormone. Nature 272: 260-262.
30. Leslie M. Hoffman and Jeffrey Ross. 1980. The role of Heme in the maturation of erythroblasts. The effects of inhibition of Pyridoxine metabolism. Blood, 55 762.
31. Stanley D., Adamson, E.H, and Kemp S.F. 1969. Effects of Hemin and other porphyrins on protein synthesis in a reticulocyte lysate cell-free system. J. Mol. Biol. 42: 247-258.
32. Harrison, P.R., Birnie G.D., Hell A, (1974) J. Mol. Biol. 84: 539-554.
33. Neilands. 1980. En: Iron Transport and Storage Proteins. Ann. Rev. Biochem. 49: pp. 358.
34. Aisen P. 1974. Annotation. The role of Transferrin in iron transport. British Journal on Haematology 26: 159.
35. Chester A, Alper, 1980. Studies of hepatic synthesis in vivo of - plasma proteins including orosomucoid, transferrin, Antitripsin, C8, and Factor B. Clin. Immunol. and immunopathol. 16: 84-89.
36. Gorinsky, B., Horsburgh, C. 1979. Evidence for the bilobal nature of diferric rabbit plasma transferrin. Nature. 281: 157-158.
37. Katz, J.H. The delivery of iron to the immature red cell: a critical review. En Morgan, E.H. Transferrin, Biochemistry, Physiology and Clinical significance, Molec. Aspects. Med, Vol. 4: 84. 1981.
38. Walsh, R. J., Thomas, E.D. 1949. Iron Metabolism. Heme synthesis in vitro by immature erythrocytes. Science, 110: 396-398.
39. Mc.Knight S., Lee C., 1980. Transferrin Gene Expression. Effects of Nutritional iron deficiency. J. Bio. Chem. 255: 144-147.
40. Goya, . En Jacobs, A., and Worwoo D.M. 1974. Iron in Biochemistry and Medicine. Academic Press, London, pp. 579.
41. Miale, Y.B., Laboratory Medicine Haematology. 4th ed. The C. V. Mosby Co. Saint Louis, 1972.

42. Wintrobe, M.M., Lee, G.R., Clinical Hematology. 7th ed. Lee and Febiger. Philadelphia, 1974.
43. Van Assendelft, O.W.: Photometry and the standardized method for the determination of Haemoglobin. Schweiz. Med. Wschr. 101: 1649, 1965.
44. International Committee for the standardization in hematology of the European Society of Hematology: Recommendations and requirements for haemoglobinometry in human blood. Nature: 119, 1963.
45. Atwater, J. and Erslev, A. J. 1972. Reticulocyte staining. En Williams W. J. Hematology, Mc Graw Hill Book Co., N.Y. p 1361.
46. Biuret method. En: Segel, Irwin H. 1968. Biochemical calculations. 2nd Ed. Wiley. N.Y. U.S.A. pp 441.
47. Mancini, G., Carbonara A.O., Heremans J.F. 1965. Immunochemical quantitation of Antigens by Single radial immunodiffusion. Immunochimistry. Pergamon Press. Vol. 2 pp. 235-254.
48. Martínez-Medellín., 1972. Studies on Transferrin and Intra-cellular Metabolism of Iron in Rabbit erythroid cells. Ph. D. thesis - University of California, San Diego.
49. Shade, A.L. Oyama J. Renhart R.W. and Miller J.R., 1954. Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 87: 443.
50. Valdés López, V.M. 1977. Estudios sobre la dinámica de formación de la sangre en conejos hechos anémicos por sangrado. Tesis Profesional, Facultad de Ciencias. UNAM, México.
51. Becerril Luján. 1979. Estudios sobre los Niveles de Acido 2,3-Difosfoglicérico (2,3-DPG) en Conejos Sujetos a un Proceso de Anemia Experimental Crónica. Tesis Profesional, Facultad de Ciencias, UNAM, México.
52. Mainero Del Paso. 1979. Estudio y caracterización de los Leucocitos de Conejo bajo condiciones de Anemia Inducida. Tesis Profesional, Facultad de Ciencias. UNAM, México.
53. Morgan, E.H. and Lynch, W. 1963. Iron Metabolism in relation with a reduction in the partial pressure of O₂. Quart. J. Exp. Physiol. Cog. Med. Sci. 48: 181-186.
54. Morgan, E.H. and Brackendrige, C.J. 1962. Iron and Transferrin - levels in the serum. Quart. J. Exp. Physiol. Cog. Med. Sci. 244: 4193-4199.

55. Harris W, and Kellermeyer, W. 1972. The Red Cell. Harvard - Cambridge. England. 94-95 p.p.
56. Bentler, E. A. et al. 1958. A comparison of the plasma iron, iron binding capacity, sternal marrow iron and other methods in clinical evaluation of iron stores. *Ann. intern. Med.* 48: 60.
57. Lane, R. S. 1968. Transferrin Synthesis in the rat: A Study Using the Fluorescent Antibody Technique. *Brit. J. Haemat.* 15: 355-364.
58. Cromwell, S. 1964. "The Metabolism of Transferrin" Peeters, H (ed): *Protides of the Biological Fluids*. Proc. 11th Colloq. 1963, p. 484. Elsevier, Amsterdam.
59. Gordon H. A. 1970. The effects of Trauma and Partial Hepatectomy on the Rates of Synthesis of Plasma Proteins by the Liver. En: Rothschild A., Marcus and Waldivann, Thomas. *Plasma Protein Metabolism*. Academic Press. New York. USA. 560.
60. Koj, A. 1974. Acute Phase Reactants. Their Synthesis, Turnover and Biological Significance. En: Allison, A. C. *STRUCTURE AND FUNCTION OF PLASMA PROTEINS*. Plenum. London. England. Vol 1 316.