

## LA ERITROPOYETINA EN ALGUNAS HEMOPATIAS (TALASEMIA Y LEUCEMIA)\*

SUNIO ICHIYANAGI

Desde que se demostró que la eritropoyesis, se encuentra sujeta a control hormonal (1), la búsqueda del sitio de producción de este factor y la fuente adecuada, de la cual la hormona eritropoyética podría ser aislada, ha sido objeto de múltiples investigaciones. Actividad eritropoyética se ha encontrado en gran variedad de fluidos orgánicos incluyendo plasma, orina (2), la leche (3) y aislamiento de material eritropoyéticamente activo de la pituitaria anterior (4, 5).

Sin embargo, tal actividad demostrada en fluidos orgánicos en forma primaria, siguió a algunos procedimientos en los que se demostró disminución en la capacidad de utilización del oxígeno por la sangre (Phenylhydrazine (6), sangrados (7), hipoxia, etc.). En estados patológicos o luego de la administración de cobalto (8); de tales entidades no ha sido posible aislar fracciones activas en cantidad suficiente para una adecuada investigación química y biológica.

En observaciones realizadas en gran número de pacientes, con diversos tipos de alteraciones hematológicas tratando de titular la eritropoyetina plasmática, se usó la incorporación del Fe<sup>59</sup> en hematíes como prueba (9) hallándose pacientes con talasemia y en determinados casos de leucemia (10), que mostraban marcada elevación en sus títulos. De la orina de estos pacientes se ha logrado la extracción de eritropoyetina de alta potencia.

Lo anteriormente expuesto nos sirve de punto de partida para la ejecución del presente trabajo que se efectuó bajo la dirección del Dr.

---

\* Tesis presentada por el autor para optar el título de Bachiller en Medicina, en setiembre de 1963, Facultad de Medicina, Universidad de San Marcos.

César Reynafarje en el Laboratorio del Instituto de Biología Andina de la Facultad de Medicina de la Universidad de San Marcos, en equipo con otras cuatro tesis sobre este interesante tema de la eritropoyetina, cubriendo los siguientes temas.

Hipoxia aguda en altura y el factor eritropoyético urinario (Farfán, A.); posibles mecanismos en la producción de la policitemia de cobalto y en la depresión medular de los nativos que son trasladados a nivel del mar (Manrique, N.); factor eritropoyético urinario y plasmático en hipoxia crónica de altura (Pérez, J.) y la eritropoyetina urinaria en anemia aplásica (Rodríguez N.).

### MATERIAL Y METODOS

En la prueba, se usaron 14 ratas blancas de ambos sexos cuyos pesos oscilaban entre 90 y 200 gramos; dos días antes del inicio de la

**Cuadro N° 1. Determinación de la Hemoglobina e incorporación de Fe59 por hematies de ratas inyectadas con extracto urinario de sujetos de nivel del mar.**

	Media $\pm$ E. S.	Desv. St. $\pm$ E. S.	Coef. var. (%)	Valores extremos
Hemoglobina Gs. %	13.68 $\pm$ 0.098	0.24 $\pm$ 0.069	1.75	12.70-14.80
Incorporac. Fe 59 %	6.08 $\pm$ 1.07	2.62 $\pm$ 0.75	43.09	2.4 -10.7

experimentación se les suspendió la alimentación excepto el agua. Las ratas fueron divididas en 3 grupos: a) el primer grupo sirvió de control y a ellas se les inyectó extracto urinario de hombres supuestamente sanos de nivel del mar; b) el segundo grupo constó de 3 ratas a las que se les inyectó extractos preparados a partir de orina de un paciente leucémico y c), finalmente, el tercer grupo constituido de 4 ratas a las que se les administró extracto de orina de una paciente con talasemia.

### PROCEDENCIA DE LAS MUESTRAS DE ORINA

Para ello se recurrió a 2 pacientes que presentaban respectivamente:

#### 1. Leucemia.

Paciente varón de 41 años de edad que ingresa el 29 de Julio de 1963 al servicio de emergencia del Hospital del Empleado por un cuadro dérmico

y gingivorragia. Desde un mes antes refiere lesiones cutáneas pruriginosas, malestar general, fiebre y dolor lumbar bilateral.

Como antecedente, en 1961 refiere un cuadro de toxicodermia tratado con antihistamínico.

El examen clínico reveló, paciente con palidez intensa de piel y mucosas, máculas pápulas generalizadas, hepato y esplenomegalia accentuados, adenopatías axilares, aumento de volumen de pierna derecha con edema maleolar y pretibial.

Examen de laboratorio.

Hemáties 1'950,000 Hb. 7.30% Hematocrito 19%.

Leucocitos 69,000 con 60% de blastos. Plaquetopenia.

Falleció al 14º día de su internamiento por hemorragia intestinal; en este lapso se le transfundió sangre y administró corticoides.

## 2. Talasemia

Paciente de 8 años, de sexo femenino, en Julio de 1961 se le diagnosticó talasemia.

Inicia su enfermedad a los 4 años de edad con dolores articulares en miembros inferiores que le impedía caminar; recibió tratamiento mejorando.

### Cuadro Nº 2. Determinación de la Hemoglobina e incorporación de Fe59 por hemáties de ratas inyectadas con extracto urinario de un paciente con leucemia

	Media ± E. S.	Desv. St. ± E. S.	Coef. var. (%)	Valores extremos
Hemoglobina Gs. %	12.03 ± 2.39	3.38 ± 1.69	28.09	9.4-13.5
Incorporac. Fe 59 %	4.22 ± 3.05	4.31 ± 2.16	102	2.2-11.4

A los 5 años de edad emite orinas como te cargado catalogándose como hepatitis, remitió el cuadro con tratamiento. En Abril de 1961 presenta astenia, palidez de piel y mucosas. Al examen hematológico se encuentra 4.5 gs. de Hb.%. Mejoró con transfusión sanguínea. Desde esa fecha a la actualidad ha presentado crisis cada 3 a 4 meses recuperándose tan sólo con transfusiones.

Como antecedentes importantes el padre presenta Hb. fetal, la madre Hb. S. Una prima y una hermana del padre fueron diagnosticadas de talasemia.

Esta paciente fue ambulatoria por lo que no se reportan otros datos.

### PREPARACION DE EXTRACTOS URINARIOS

Las muestras obtenidas se preparan siguiendo el método de Hodgson y col. que consiste en lo siguiente:

1. Se colecta 1,000 c.c. de cada muestra y se filtra con papel de filtro grueso.

2. Se acidifica con ácido acético 0.5 M. para llevar el pH a 4.5.
3. Se añade alcohol etílico de 90° en cantidad que represente 4 veces el volumen de orina más el ácido acético usado. Se agita y se conserva en refrigeradora entre 12 y 20 horas.
4. Se reparte en frascos de tamaño uniforme y se centrifuga durante 20 minutos a 3,000 min.; se elimina el líquido sobrenadante y el sedimento se disuelve con 10 c.c. de fosfato ácido de sodio 0.01 M.; acto seguido esta mezcla se vuelve a centrifugar por 30 minutos a 1,500 min.
5. El sobrenadante representa el extracto urinario alcohólico que debe guardarse herméticamente cerrado en congeladora.

#### PREPARACION DEL Fe 59

Se empleó el Citrato Ferroso radioactivo diluyente 1 microcurie del mismo por c.c. de agua destilada. Hay que tener en cuenta que la solución comercial de este producto tiene 30 micro-curies por c.c. y que la vida media de este elemento en estas condiciones es de 47 días.

**Cuadro Nº 3. Determinación de la Hemoglobina e incorporación de Fe59 por hematíes de ratas inyectadas con extracto urinario de una paciente con talasemia**

	Media $\pm$ E. S.	Desv. St. $\pm$ E. S.	Coef. var. (%)	Valores extremos
Hemoglobina Gs. %	14.45 $\pm$ 0.25	0.43 $\pm$ 0.18	2.97	12.1-15.5
Incorporac. Fe 59 %	16.7 $\pm$ 2.37	4.11 $\pm$ 1.68	23.35	9.8-23.9

#### TECNICA DE ADMINISTRACION DE LAS SUSTANCIAS

Se usó la vía intraperitoneal inyectando 2 c.c. del extracto urinario correspondiente tanto en la mañana como en la tarde durante 2 días, al tercer día se inyectó el extracto en la mañana y en la tarde se le puso 1 c.c. de Fe 59.

#### OBTENCION DE LAS MUESTRAS DE SANGRE

Veinticuatro horas después de aplicado el Fe 59:

1. Anestesia de las ratas con algodones embebidos de éter.
2. Se sujetan firmemente en tablillas de disección.
3. Se localiza el corazón y se procede a extraer sangre con jeringa previamente humedecida con liquemine (anticoagulante).
4. Se extrae apropiadamente 2 c.c. de sangre, se toma 1 c.c. para lectura de la radioactividad con el contador nuclear.

## DOSAJE DE LA HEMOGLOBINA

1. Se coloca 20 cmm. de sangre en tubos de ensayo que contengan 10 c.c. de agua destilada.
  2. Se agrega 1 o 2 gotas de amoníaco.
  3. Previa agitación se hace la lectura en el fotocolorimetro de Evelyn.
- Los resultados obtenidos se convierten por medio de tablas.

## RESULTADOS

Las determinaciones de Hb. y la incorporación de Fe 59 en 7 ratas inyectadas con extracto urinario de nivel del mar fueron respectivamente  $13.68 \pm 0.098$  y  $6.085 \pm 1.07$  lo cual representamos en el cuadro I.

Dosajes semejantes con extractos urinarios de un enfermo leucémico que se aplicaron a 3 ratas nos dieron:  $12.03 \pm 2.39$  y  $4.22 \pm 3.05$ , lo que es expuesto en el cuadro II.

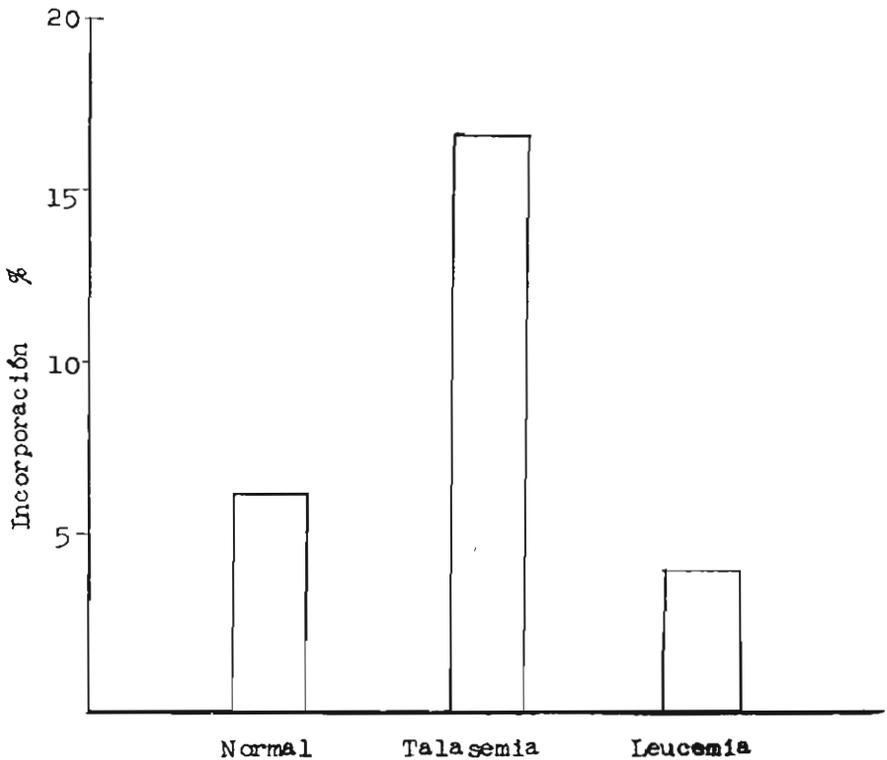
Cuadro 4. Cuadro comparativo de la incorporación de Fe 59%

	Media $\pm$ E. S.	Desv. St. $\pm$ E. S.	Coef. var. (%)	Valores extremos
Normal	$6.085 \pm 1.07$	$2.62 \pm 0.75$	43.09	2.4-10.7
Leucemia	$4.22 \pm 3.05$	$4.31 \pm 2.16$	102	2.2-11.4
Talasemia	$16.7 \pm 2.37$	$4.11 \pm 1.68$	23.35	9.8-23.9

Finalmente los valores medios de Hb en Fe59, en 4 ratas a las que se aplicó extracto urinario de una paciente con talasemia nos presentó como cifras finales:  $14.45 \pm 0.25$  y  $16.7 \pm 2.37$  resultado que se sintetiza en el cuadro III.

Las ratas con extractos leucémicos tuvieron en comparación con las inyectadas de extractos de nivel del mar disminuciones de 1.65 con respecto a la Hb y de 1.865 en relación a la incorporación de Fe59.

En cuanto al extracto urinario de la enferma de talasemia tuvimos: en relación a la que se usó como comparación aumentos de 0.77 con la Hb y de 3.715 con el Fe59.



#### DISCUSION

Las experiencias realizadas, utilizando como materiales de prueba orina de sujetos normales y de otros con alteraciones hematológicas en el estudio de la captación de Fe 59 por ratas blancas adultas, nos permiten mostrar el aumento habido en uno de ellos, con respecto a los valores de los otros dos grupos. De estas muestras problemáticas la que resultó positiva, es decir, con aumento de la captación de Fe 59 correspondía a una enferma talasémica y las otras dos indiferentes, a un enfermo leucémico y a sujetos supuestamente sanos del nivel del mar.

Se ha reportado por Van Dyke et al. (8), que en algunos pacientes con elevada actividad en el plasma se encuentran tasas elevadas de la sustancia eritropoyética en la orina. Se informa, también, que cuando se administra orina de tales enfermos a ratas adultas por un lapso determinado, se produce policitemia; así Medici et al. han

hallado experimentalmente que en el plasma de pacientes con anemia de Cooley la orina era no sólo efectiva en aumentar la incorporación de Fe 59, sino que la inyección prolongada de la misma devenía en la producción de una policitemia.

En nuestro estudio usamos ratas ayunadas 48 horas antes de la experiencia, así como ciertas técnicas basadas en un trabajo hecho sobre el aumento de la incorporación del Fe 59 en ratas sometidas a altitud simulada (11).

Se sabe que la estimulación en el aumento de Fe 59 se debe a la presencia de una sustancia hormonal, la eritropoyetina (7). La eritropoyetina fue prevista desde 1906 por Carnot y Deflandre, recibiendo tan sólo en los últimos tiempos confirmación de su existencia por experiencias hechas; tanto en el plasma como en orina de sujetos que suben a la altura (12), en algunas alteraciones hematológicas (13), así como en animales de laboratorio puestos en altitud simulada (11), sometidos a sangrados (2, 8), hipofisectomizados (4), con la phenylhydrazine (6) y a inyecciones prolongadas de cobalto (14). Esta sustancia hormonal se supone sea producida a nivel renal (1) y que la hipoxia tisular sea la causa inductora de su producción y liberamiento (4). Respecto a su constitución química, la opinión de los investigadores está inclinada hacia la posibilidad de que sea una glucoproteína (6).

El hecho que nos movió a efectuar el siguiente trabajo, fueron los informes de algunos experimentadores que al estudiar pacientes anémicos encontraban actividad eritropoyética tan o en el plasma como en la orina de los mismos (8); sin embargo no refieren esto como constante, habiendo al parecer ciertas combinaciones en su presentación: en la anemia hemolítica con baja de Hb e hiperactividad medular y en la anemia hipoplásica con médula hipoactiva y tasas disminuidas de Hb serían constantes estos hallazgos; en otros, por el contrario, tendríamos en unos casos aumento de eritropoyetina tanto en el plasma como en la orina, en unos terceros tan sólo en el plasma y en unos últimos tan sólo en la orina.

Nuestros resultados nos llevan a las disquisiciones siguientes: en la talasemia hay aumento evidente en el estímulo de la producción hemática, pues hoy incremento en la captación de Fe 59 que depende a su vez de la cantidad de eritropoyetina habida en la orina, refiriéndose también constatación semejante en el plasma (11).

Nuestras experiencias hechas con orina de una enferma leucémica dio captaciones de Fe 59 bajas, lo cual indica ausencia de estímulo eri-

tropoyético en tales muestras, esto concuerda con reportes hechos de pacientes con anemia severa en cuyas orinas no se evidenciaba ninguna actividad eritropoyética. Van Dyke (10), establece las tres siguientes categorías con respecto a la orina de enfermos anémicos: 1) aquellos sin actividad, aun cuando se extracten grandes cantidades de este elemento; 2) las que la poseen en pequeña cantidad pero en forma definida; 3) las que tienen títulos elevados. Investigaciones realizadas con orinas de este último grupo informan que cuando se asocian al cuadro anémico principal algunos disturbios tales como: anomalías congénitas, hipogamaglobulinemia o bien trastornos en el metabolismo del triptófano, se presentarían títulos elevados de eritropoyetina en la orina por existencia de falla en la remoción de la hormona de la circulación.

En nuestro caso podríamos explicar, en base a lo expuesto diciendo que la ausencia de respuesta eritropoyética luego de inyectar la orina de la enferma leucémica sea probablemente debida al normal funcionamiento en el metabolismo de la hormona, a pesar de que el estímulo anémico induce elevación de la eritropoyetina en el plasma.

## CONCLUSIONES

En nuestras experiencias, realizadas con 14 ratas inyectadas con extractos urinarios de hombres del nivel del mar, de una talasémica y un leucémico respectivamente; nos permiten llegar a las siguientes conclusiones:

- (1) La inyección de extracto urinario de la enferma con talasemia, produce aumento en la incorporación de Fe<sup>59</sup>, indicando la existencia del factor eritropoyético urinario.
- (2) En el caso presente de leucemia no se encontró aumento de la captación de Fe<sup>59</sup> luego de administrar extracto urinario de los mismos, se discuten las causas.

## BIBLIOGRAFIA

1. Tocantins L. M.: *Progresos en hematología*. Ed. Científico Médica, cap. 4. 1961.
2. Hodgson, G. and Toha, J.: The erythropoietic effect of urine and plasma of repeatedly bled rabbits. *Blood*, 9: 299. 1954.
3. Grant, W. C.: *Blood* 10: 334. 1955.

4. Fisher, J. W. and Crook, J. J.: Influence of several hormones on erythropoiesis and oxygen consumption in the hypophysectomized rat. *Blood*, 19: 557, 1962.
5. Macfarlane, R. G. and A. H. T. Robb-Smith: *Function of the blood*, ed. N.Y. Academic Press, cap. 8, 1961.
6. Wintrobe, M.: *Clinical hematology*. Ed. 5, N.Y. Lea Fibiger, cap. 2, 1961.
7. Jacobson, L. O. and Goldwasser, E.: *The dynamic equilibrium of erythropoiesis*. Brookhaven Symposia in Biology.
8. Van Dyke, D. C.; García, J. F. and Lawrence, J. H.: Biological and chemical characteristics of urinary erythropoietin. 2nd. UN: Genova Conference.
9. Plzak, L. F. et al.: Demonstration of stimulation of erythropoiesis by plasma from anemic rats using Fe59. *J. Lab. and Clin. Med.* 46: 671, 1955.
10. Van Dyke, D. C.: Sources and properties of human urinary erythropoietin. CIBA foundation symposium on Haemopoiesis cell production and its regulation Ed. 1, 397, 1960.
11. Reynafarje, C. and Ramos, J.: Influence of plasma filtrate containing erythropoietic factor on intestinal iron absorption in rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 109: 868, 1962.
12. Reynafarje, C.: V Congreso Latinoamericano de Ciencias Fisiológicas. Symposium sobre eritropoyetina. Caracas, 1963.
13. Weinstein, I. M.: *Mechanisms of anemia*. Ed. N.Y. Mc Graw Hill Company, cap. 1, 1962.
14. Goldwasser, E.; Jacobson, L. O., Fried, W. and Plzak, L.: Mechanism of the erythropoietic effect of cobalt. *Science*. 125: 1085, 1957.