

## FACTOR ERITROPOYETICO Y PLASMATICO EN HIPOXIA CRONICA DE ALTURA\*

JUAN JULIO PÉREZ ENCISO

El presente trabajo ha sido iniciado por la incesante preocupación, en cuanto a la investigación de la eritropoyetina, que corresponde a uno de los capítulos amplios e importantes de la Hematología.

Esta labor de investigación se desarrolla en el instituto de Biología Andina de la Facultad de Medicina de San Fernando, que cuenta con un laboratorio central en Lima, y otro en la ciudad minera de Morococha, a 4,540 metros sobre el nivel del mar, situado en la Sierra Central del Perú.

Con las amplias facilidades prestadas por el Instituto, ha sido posible llevar a cabo éste trabajo, para el cual un grupo de seis estudiantes de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos nos trasladamos a dicho lugar para la recolección del material de trabajo.

Pensando en el mecanismo complicado de un factor humoral plasmático, que desde el año 1906 ha sido denominado por Carnot y Deflandre, como hemopoyetina; posteriormente Grant y Root (1) hicieron una revisión referente al estímulo fundamental de la eritropoyesis, a esa sustancia eritropoyética estimulante, Bonsdorff y Jalavisto (2) han referido como eritropoyetina. En 1950 Reissmann (3) hizo experiencias en ratas parabióticas evidenciando un factor estimulante eritropoyético, luego de situarlas en una atmósfera hipóxica.

Erslev (4) y Gordon (5) han descrito un factor en la sangre de animales anémicos que estimula la eritropoyesis en animales receptores. Viault (6) en 1890, estudió la influencia de las grandes alturas.

---

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

Paul Bert (7) suponía que la adaptación de la vida a elevadas alturas podría ser facilitada por el aumento de glóbulos rojos, contrarrestando la escasa saturación de oxígeno a bajas presiones barométricas, entonces comprobó que la hipoxia es un estímulo de la eritropoyesis.

Prentice y Mirand (8) refirieron que los extractos de plasma y orina en conejos llevados al 10% de oxígeno, muestran incremento paralelo de la eritropoyetina durante las primeras 48 horas, luego una disminución gradual, posiblemente, a la aclimatación hematológica.

Entre nosotros Reynafarje (9) ha encontrado un incremento de la eritropoyetina en sujetos de nivel del mar sometidos a la hipoxemia de la altura a las 24 horas de exposición.

**Tabla N° 1. Cuadro comparativo de las cifras de hemoglobina en gramos por 100 y la incorporación de Fe 59, después de inyectar extractos urinario de nivel del mar y de nativos**

	Med. $\pm$ E. S.	Desv. St. $\pm$ E. S.	Coef. Var. (%)	Val. Ext.
Hb. Gr. por 100 cc.	13.68 $\pm$ 0.09	0.24 $\pm$ 0.06	1.75	12.40 — 14.80
1 Fe 59 %	6.08 $\pm$ 1.06	2.61 $\pm$ 0.75	4.29	2.4 — 10.7
Hb. Gr. %	13.80 $\pm$ 0.38	0.76 $\pm$ 0.27	5.5	12.50 — 14.70
2 Fe 59 %	4.18 $\pm$ 0.88	1.76 $\pm$ 0.72	42	2.6 — 7.4

1. Extracto urinario de sujetos de nivel del mar.
2. Extracto urinario de nativos.

Estos hallazgos indujeron a investigar el factor eritropoyético urinario y plasmático de los sujetos residentes en Morococha, donde la altitud de 4,540 metros, con una presión barométrica de 446 mm. Hg. determinan un estado de hipoxia, queda, pues, una interrogante, si el factor eritropoyético urinario o plasmático se hace patente en animales experimentales.

Para abarcar y relacionar el factor eritropoyético en sus diferentes y múltiples aspectos el trabajo en mención se complementa con

los de: Farfán Oviedo A., Ichiyonagi S., Manrique N., y Rodríguez N., cuyos trabajos fueron efectuados en equipo en el Instituto de Biología Andina.

## MATERIAL Y METODOS

En el presente trabajo hemos estudiado el factor eritropoyético urinario y plasmático de personas de altura, para el cual se ha utilizado lo que a continuación se describe:

- 1) Dos sujetos sanos residentes de Morococha por más de dos años.
- 2) Se empleó tres grupos de ratas albinas.

**Tabla N° 2. Cuadro comparativo de las cifras de hemoglobina en gramos por 100 y la incorporación de Fe 59, después de inyectar extracto urinario liofilizado de nivel del mar y de nativos**

	Med. $\pm$ E. S.	Desv. St. $\pm$ E. S.	Coef. Var. (%)	Val. Ext.
Hb. Gr. por 100 cc.	15.32 $\pm$ 0.11	0.20 $\pm$ 0.08	1.29	14.30 — 16.00
1 Fe 59 %	3.8 $\pm$ 1.46	2.54 $\pm$ 1.04	66.76	0.4 — 6.3
Hb. Gr. por 100 cc.	14.32 $\pm$ 0.19	0.37 $\pm$ 0.13	2.58	14.00 — 15.00
2 Fe 59 %	2.2 $\pm$ 0.85	0.17 $\pm$ 0.60	7.76	1.7 — 3.2

1. Extracto urinario liofilizado de sujetos de nivel del mar.

2. Extracto urinario liofilizado de nativos.

El primer grupo consta de 12 ratas de ambos sexos con un peso promedio de 149 gramos, de las cuales 7 para control y 5 para nativos.

El segundo grupo consta de 9 ratas, con peso promedio de 130 grs., siendo 4 ratas para control y 5 para nativos.

El tercer grupo consta de 10 ratas con peso promedio de 121 grs., de las cuales 5 ratas para control y 5 para la inyección del extracto problema de nativos.

## TECNICA DE PREPARACION DEL EXTRACTO URINARIO

Según la técnica seguida por Hodgson para obtener la muestra urinaria es la siguiente:

La orina se conserva inmediatamente después de emitida en una cámara de refrigeración en un frasco completamente limpio.

## PREPARACION

Se trabajó a partir de 1.000 cc. de orina.

a. Filtrar con papel de filtro grueso, también se puede centrifugar durante 10 minutos y luego se separa el sedimento.

**Tabla N° 3. Cuadro comparativo de las cifras de hemoglobina en gramos por 100 y la incorporación de Fe 59, después de inyectar extracto plasmático de nivel del mar y de nativos**

	Med. ± E. S	Desv. St. ± E. S.	Coef. Var. (%)	Val. Ext.
Hb. Gr. por 100 cc.	13.72 ± 0.94	1.89 ± 0.67	13.82	11.60 — 17.30
1 Fe 59 %	3.26 ± 0.81	1.62 ± 0.57	49.84	1.34 — 5.85
Hb. Gr. por 100 cc.	12.68 ± 0.69	1.36 ± 0.48	10.72	11.40 — 15.40
2 Fe 59 %	4.31 ± 0.93	1.85 ± 0.65	42.99	1.60 — 6.55

1. Extracto plasmático de nivel del mar.
2. Extracto plasmático de nativos.

b. Mediante un papel reactivo se prueba el pH previamente, llevar a un pH de 4.5 con ácido 0.5 M. (se necesita a una proporción de 10 cc. para 300 cc.).

c. Medir el volumen de ácido acético usado y agregar a los centímetros cúbicos de orina. El resultado multiplicarlo por 4.

$$(1000 + 30 = 1030 \times 4 = 4120)$$

El resultado nos da 4.120 cc. que será el volumen del alcohol etílico a emplearse.

d. Agregar el alcohol etílico agitando lentamente la orina.

e. Dejar en congeladora 12 horas como mínimo, y hasta 20 hrs. como máximo. luego aparece un precipitado blanco.

f. Se agita la orina hasta homogenizar y se centrifuga a 3.500 r.p.m. durante 20 minutos.

g. Descartar el sobrenadante, escurriendo bien el alcohol colocando el tubo de centrifuga en posición invertida. El precipitado se disuelve en buffer de fosfato ácido de sodio 0.01 M. (de 10 a 20 cc.).

h. Centrifugar a 2.000 r.p.m. durante 30 minutos. Separar el sobrenadante, medirlo exactamente y guardarlo congelado.

**Cuadro comparativo de las cifras de hemoglobina e incorporación del Fe 59, luego de inyectar extracto urinario**

Nº Ratas	Extracto urinario de hombres de nivel del mar		Extracto urinario de nativos	
	Hb. gr. %	Fe 59-%	Hb. gr. %	Fe 59-%
1	12.8	3.7	12.5	4.7
2	12.7	10.7	13.6	3.2
3	14.8	7.7	14.4	2.6
4	13.2	2.4	14.7	7.4
5	13.9	4.3	13.8	3.0
6	13.9	7.1		
7	14.5	6.7		

Este sobrenadante obtenido por el proceso mencionado se inyecta intraperitonealmente en ratas albinas sometidas a invernación durante dos días consecutivos. al tercer día se inyecta por la vía parenteral de 1 a 2 cc. de extracto en la mañana y en la tarde según cada caso. De igual manera se procede al cuarto día y al quinto se inyecta por vía intraperitoneal 1 microcurie de Fe 59 diluido en 1 cc. de suero fisiológico. A las 24 horas de la aplicación de fierro radioactivo se sacrifica al animal previa anestesia.

**REACTIVOS**

Se utilizó alcohol etílico de 96%.

Acido acético al 0.5 Molar:

1. Medir 14.4 cc. de ácido acético glacial.
2. Completar a 500 cc. con agua destilada y conservarlo en congeladora.

### PREPARACION DEL BUFFER PARA LA DILUCION DEL SEDIMENTO URINARIO

1. Se pesan 3.580 gramos de fosfato ácido de sodio, 12 moléculas de agua, completar a 100 cc. disolviendo en agua destilada tibia, ésta es la solución patrón. Para su uso se disuelve 1 cc. de la solución en 100 cc. de agua destilada

2. Luego se toma 100 cc. para cada tubo de sedimento.

### TECNICA PARA LA DETERMINACION DE HEMOGLOBINA

1. Medir 10 cc. de agua destilada.

2. Agregar 20 cmm. de sangre obtenida de la extracción de animales (ratas).

3. Añadir una o dos gotas de  $\text{NH}_3$ .

4. Agitar y proceder a la lectura en el fotocolorímetro de Evelyn, previamente calibrado con filtro de 540 m $\mu$ .

### Cuadro comparativo de las cifras de hemoglobina e incorporación del Fe 59, luego de inyectar extracto urinario liofilizado

Nº Ratas	Extracto urinario liofilizado nivel del mar		Extracto urinario liofilizado de nativos	
	Hb. gr. %	Fe 59-%	Hb. gr. %	Fe 59-%
1	16.0	2.5	15.0	3.2
2	15.5	6.3	14.1	2.3
3	15.5	0.4	14.0	1.8
4	14.3	6.0	14.4	1.7
5			14.1	2.0

### LECTURA EN EL CONTADOR NUCLEAR

Es un aparato que registra la radioactividad tanto del medio ambiente como de las sustancias radioactivas, cuyo conteo se hace teniendo en cuenta la unidad de tiempo. (1 minuto).

Se procede de la siguiente manera:

1. En un tubo de Vial se toma 1 cc. de sangre extraída de ratas.
2. Determinar la lectura del B.G. que es la radioactividad del medio ambiente.
3. Lectura del Standard del Fe 59.
4. Lectura de las muestras respectivas.

### PREPARACION DE LA SOLUCION DE Fe RADIOACTIVO

Para preparar, se tiene en cuenta el tiempo de vida media de la sustancia radioactiva que le corresponde a 47 días.

1. La solución de Fe 59, se halla protegida en una cubierta de Pb. y posee 30 microcuries en cada cc.
2. Mediante una jeringa milimetrada y estéril se extrae 0.1 de cc., para disolverlo en agua destilada.
3. En 0.1 cc. de la solución habrán 3 microcuries.
4. La proporción de Fe 59 que se inyecta por vía intraperitoneal es de 1 microcurie diluido en 1 cc. de suero fisiológico.

### TECNICA DE PREPARACION DEL EXTRACTO PLASMATICO

1. Se extrajo 250 cc. de sangre en un equipo descartable estéril, de

#### Cuadro comparativo de las cifras de hemoglobina e incorporación del Fe 59, luego de inyectar extracto plasmático

Nº Ratas	Extracto plasmático de nivel del mar		Extracto plasmático de nativos	
	Hb. gr. %	Fe 59-%	Hb. gr. %	Fe 59-%
1	17.3	1.8	13.1	6.55
2	13.5	4.0	11.4	2.91
3	13.1	1.34	15.1	1.6
4	13.1	5.85	12.4	6.0
5	11.6	3.3	11.4	4.5

dos sujetos jóvenes, aparentemente sanos y residentes por varios años en Morococha. Previamente se tomó medidas adecuadas para el paciente (Posición, presión arterial etc.) y del equipo que contiene un anticoagulante en cantidad suficiente para 250 cc. de sangre.

2. Agitar suavemente la sangre extraída.
3. Centrifugación a 3,500 r.p.m. durante 30 minutos.
4. Separar el sobrenadante mediante una aguja conectada a un mecanismo de aspiración.
5. El plasma obtenido se conserva congelado en un frasco estéril.
6. Esta muestra plasmática se inyecta por vía parenteral (intrap).

### TECNICA DE LIOFILIZACION

La liofilización de los extractos urinarios, fueron efectuadas en el Laboratorio "Phillips" (de productos veterinarios).

Este procedimiento físico es llevado a cabo en dos etapas:

- a. Congelación.
- b. Evaporación.

El extracto separado en frascos cuya capacidad es de 20 cc. debiendo ser de vidrio neutro, se pone el extracto y es congelado en una platina de congelación a una temperatura de  $-40^{\circ}$  C., luego en otra platina y por un aparato de vacío, el producto congelado se vaporiza.

Se han obtenido frascos a los cuales se deberá agregar agua destilada en cantidad suficiente, según la concentración deseada.

Cada frasco ha sido disuelto con 10 cc. de agua destilada, por consiguiente la dosis se ha duplicado. La cantidad que se inyectó es de 2 cc.

## MÉTODOS EXPERIMENTALES

### PRIMER GRUPO. Extracto urinario

Se han empleado 12 ratas, que fueron sometidas a ayuno durante dos días consecutivos.

#### A. Siete ratas de control.

1. Inyección parenteral de extracto urinario del nivel del mar a la dosis de 1 cc. en la mañana y 1 cc. en la tarde durante dos días consecutivos, al tercer día sólo en la mañana.

2. Al tercer día en la tarde se inyectó por vía parenteral 1 cc. de solución de citrato de Fe 59 equivalente a un microcurie.

3. Después de 24 horas de la inyección de Fe 59, se sacrifica al animal previa anestesia y se efectúa la extracción de sangre aproximadamente 2 cc., por punción intracardiaca, mediante una jeringa heparinizada. Se toma la muestra sanguínea para su determinación de hemoglobina y el conteo de radioactividad.

#### B. Cinco ratas problema.

1. A cinco ratas se les inyectó por vía intraperitoneal, extracto urinario de nativos de altura durante dos días consecutivos y al tercer día sólo una dosis en la mañana (1 cc. en la mañana y 1 cc. en la tarde).

2. Inyección de Fe 59 en la misma forma que las de control.

3. Después de 24 horas de la aplicación de 1 cc. de Fe 59, también se procede en la misma forma que las de control.

### SEGUNDO GRUPO. Extracto urinario liofilizado

Se han empleado un total de 9 ratas albinas, sometidas a ayuno durante dos días consecutivos.

#### A. Cuatro de control.

1. Inyección de extracto urinario liofilizado de sujetos a nivel del mar, por vía intraperitoneal, a la dosis de 2 cc. en la mañana y dos cc. en la tarde durante 2 días consecutivos, y al tercer día 2 cc. en la mañana.

2. Al tercer día se inyectó por vía intraperitoneal 1 cc. de la solución de Fe 59.

3. Después de 24 horas de la inyección de Fe 59 se sacrifica al animal previa anestesia y se efectúa la extracción de sangre, aproximadamente 2 cc., por punción intracardiaca.

4. Determinación de hemoglobina y el porcentaje de incorporación Fe 59.

#### B. Cuatro ratas problema.

1. Inyección de extracto urinario liofilizado de nativos de altura, por vía intraperitoneal, a la dosis de 2 cc. en la mañana y 2 cc. en la tarde, durante dos días consecutivos, al tercer día 2 cc. en la mañana.

2. Al tercer día en la tarde inyección de Fe 59, en la misma forma que las de control.

3. Después de 24 horas de la inyección de Fe 59 se procede en la misma forma que las de control del segundo grupo.

#### TERCER GRUPO. Extracto Plasmático.

Se han empleado un total de 10 ratas, sometidas a ayuno durante dos días consecutivos.

##### A. Cinco de control.

1. Inyección de extracto plasmático de sujetos de nivel del mar, por vía intraperitoneal, a la dosis de 2 cc. en la mañana y 2 cc. en la tarde, durante dos días consecutivos, y el tercer día 2 cc. en la mañana.

2. Al tercer día en la tarde se inyecta Fe 59 por vía intraperitoneal la dosis de 1 cc.

3. Después de 24 horas de la inyección de Fe 59, se procede en la misma forma que las del segundo grupo de control.

##### B. Cinco ratas problema.

1. Inyección de extracto plasmático de nativos de altura por vía intraperitoneal, a la dosis de 2 cc. en la mañana y 2 cc. en la tarde, durante dos días consecutivos y al tercer día solamente 2 cc. en la mañana.

2. Al tercer día en la tarde se inyecta Fe 59 1 cc.

3. Después de 24 horas de la inyección de Fe 59, se sacrifica al animal previa anestesia y se efectúa la extracción de sangre, aproximadamente 2 cc., por punción intracardiaca.

4. Se toma la muestra sanguínea para su determinación de hemoglobina y su respectiva captación de fierro radioactivo.

Como resumen, los tres grupos de animales estuvieron en condiciones ambientales apropiadas en el vivero del Instituto de Biología Andina.

METODOS ESTADISTICOS

En el experimento se han empleado las siguientes fórmulas, tanto para los dosajes de hemoglobina como para los porcentajes de la captación de Fe radioactivo.

1. Media =  $\bar{V}$

$$V_1 = \frac{\sum X}{n}$$

$$V_2 = \frac{\sum X}{n}$$

$$\pi^2 = V_2 - (V_1)^2$$

2.  $b = \sqrt{\pi^2}$

3.  $\frac{\text{Desviación Standard} \times 100}{\text{Media}}$

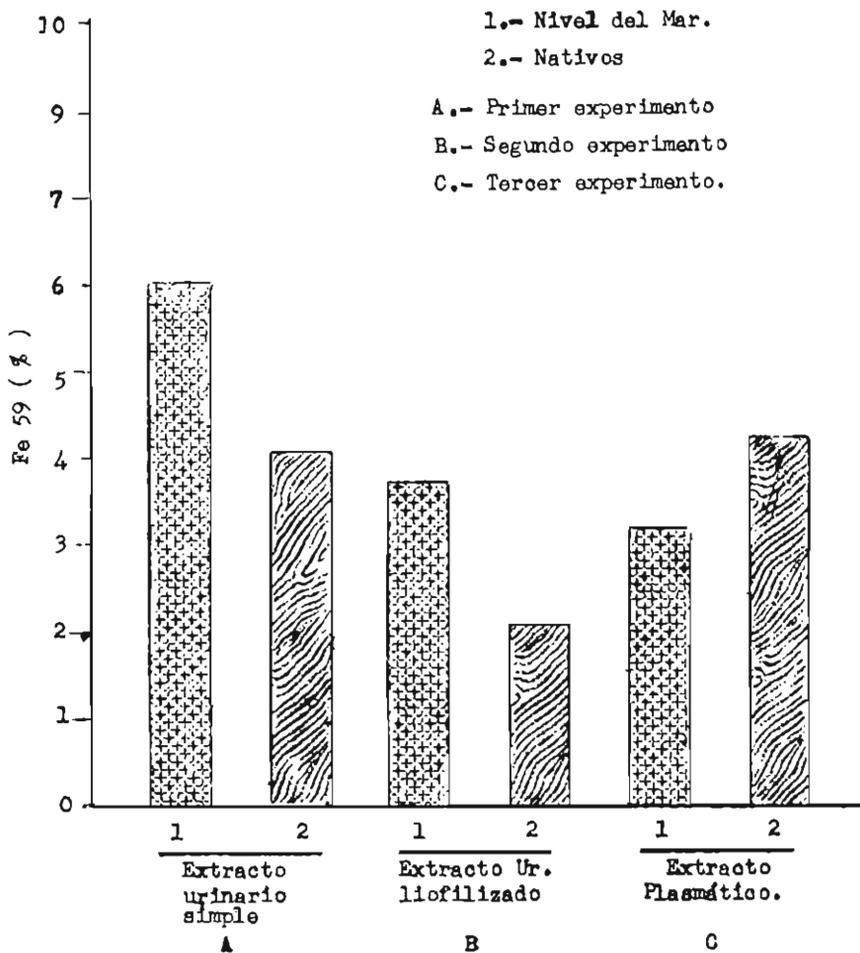
4.  $\frac{\text{Desviación Standard}}{\sqrt{n - 1}}$

5.  $\frac{\text{Desviación Standard}}{\sqrt{2(n - 1)}}$

1. Media.
  2. Desviación Standard.
  3. Coeficiente de Variación.
  4. Error Standard de la media.
  5. Error Standard de la Desviación Standard.
- Valores extremos.

Gráfica del porcentaje de incorporación de Fe 59, después de inyectar extracto urinario, extracto urinario liofilizado y extracto plasmático de sujetos de nivel del mar y de nativos

FIGURA N° 1



## RESULTADOS

Después de la aplicación de extracto urinario y plasmático en animales experimentales, los resultados son los siguientes:

Como se ve en la tabla N<sup>o</sup> 1 y en la fig. 1, la inyección de extracto urinario de sujetos residentes en Morococha da una cifra de Media  $\pm$  E. S. =  $4.18 \pm 0.88$ , que es la media de la incorporación de Fe 59, mientras que la inyección de extracto urinario de nivel del mar es de: Media  $\pm$  E. S. =  $6.08 \pm 1.06$ , encontrándose un predominio del último extracto.

En la Tabla N<sup>o</sup> 2, fig. 1, se observa que después de la inyección de extracto urinario liofilizado de nativos nos da: Media  $\pm$  E. S. =  $2.2 \pm 0.85$ , que es la media y el error standard de la incorporación de Fe 59; las cifras después de la inyección de extracto urinario liofilizado de nivel del mar es de: Media  $\pm$  E. S. =  $3.8 \pm 1.46$ , comparando resulta que el extracto de nativos arroja cifras menores.

Relacionando las cifras medias del extracto urinario de nivel del mar (6.08), y de nativos (4.18) resultan, en general, mayores que los resultados del extracto urinario liofilizado de nivel del mar (3.8) y de nativos (2.2). Fig. N<sup>o</sup> 1.

En la tabla N<sup>o</sup> 3 y Fig. N<sup>o</sup> 1, indican los resultados después de la aplicación de extracto plasmático de sujetos residentes en la altura que es de: Media  $\pm$  E. S. =  $4.31 \pm 0.93$  (Media y Error Standard del porcentaje de incorporación del Fe 59); y después de la aplicación de extracto plasmático de sujetos de nivel del mar es de: Media  $\pm$  E. S. =  $3.26 \pm 0.81$ . En éste experimento si hubo mayor porcentaje de incorporación del Fe 59, con el extracto de nativos (4.31), en relación a 3.26 de nivel del mar.

Las demás cifras de Desviación Standard, E. S. de la Desviación Standard, coeficiente de variación y valores extremos se indican en las tablas 1, 2 y 3, respectivamente.

## DISCUSION

Hodgson y Tohá (10) comunicaron que en la orina de conejos sometidos a la hipoxia, era posible demostrar la existencia de actividad eritropoyética, así como también en la orina de conejos anemizados por sangrado.

Generalmente es considerado que el estado de oxigenación tisular controla la liberación de eritropoyetina en respuesta a una disminución de la capacidad de oxígeno (11). Los niveles de eritropoyetina

plasmática son influenciados por el estado funcional del tejido eritroide de la médula, así como la severidad del estímulo hipóxico.

Según Mirand y Prentice (12) parece existir una relación directa entre las propiedades eritropoyético-estimulante del extracto plasmático y urinario. En aquellos pacientes anémicos en los que niveles de eritropoyetina estuvo presente en extracto plasmático, también se encontró en extracto urinario.

Del análisis de los datos existentes, el extracto urinario de sujetos residentes normales de altura no muestran incremento de la actividad eritropoyética. En cambio, se ha encontrado actividad eritropoyética en algunos pacientes anémicos con menos de 6 grs. de hemoglobina, que son descritos por (13, 14).

En los resultados del extracto urinario liofilizado demuestran no haber incremento de la actividad eritropoyética, a pesar que la dosificación del extracto ha sido mayor (4 veces).

La presencia de un factor humoral capaz de estimular el proceso eritropoyético fue encontrado en animales expuestos a baja tensión, estudiados por Stohlman (15) y Reissmann (3) y elevó la posibilidad de explicar la acción del estímulo anóxico a través de éste factor humoral. Estos problemas de altura han sido aprovechados por Merino (16) quien inyectó 250-300 cc. de plasma de nativos de altura a sujetos de nivel del mar, encontrando una reticulocitosis máxima entre el segundo y cuarto día, en contraste a la falta de respuesta reticulocitaria del plasma obtenido a nivel del mar.

En el experimento hecho por nosotros con extracto plasmático de nativos de altura y de nivel del mar, y usando como método la incorporación de Fe 59, no hemos encontrado incremento de la actividad eritropoyética en las ratas que fueron inyectadas con dichos extractos de plasma de nativos de altura. En otros estudios realizados por Van Dyke (17) tampoco se observa incremento de la eritropoyetina en nativos de altura.

Teóricamente es poco probable la existencia de incremento de eritropoyetina, por cuanto en los nativos de altura hay un equilibrio entre los procesos de formación y destrucción sanguínea.

En la única circunstancia que se ha demostrado evidente incremento de la eritropoyetina en el plasma, es en la exposición aguda a la altura, después de las 24 horas (9).

Es probable que con métodos más sensibles se logre más tarde encontrar diferencias entre los nativos de altura y los sujetos de nivel del mar, que ahora no se logra con los métodos existentes.

## CONCLUSIONES

De los ensayos en animales experimentales, después de inyectar los extractos urinario y plasmático de sujetos residentes de altura, se citan las siguientes conclusiones:

1. No se ha encontrado incremento del factor eritropoyético urinario en personas normales, residentes de altura.
2. No se encontró incrementando el factor eritropoyético plasmático de sujetos normales residentes de altura.

Son necesarias nuevas investigaciones, con métodos más sensibles para aclarar definitivamente, si existe o no un incremento de la eritropoyetina plasmática y urinaria en los nativos de altura.

## BIBLIOGRAFIA

1. Grant, W. C., y Root, W. S.: Fundamental stimulus for erythropoiesis. *Physiol. Revs.*, 32:449, 1952.
2. Bonsdorff, E., y Jalavisto, E.: *Acta Physiol. Scand.* 16:150, 1948.
3. Reissmann, K. R.: The mechanism of erythropoietic stimulation in parabiotic rats during hypoxia. *Blood*, 5: 372, 1950.
4. Erslev, A. J., y Lavietes, P. H.: Observations on the nature of the erythropoietic serum factor. *Blood*, 9: 1055, 1954.
5. Gordon, A. S., Piliero, S. J., y Tannenbaum, M.: Erythropoietic activity of Blood and tissues of anemic rabbits. *Am. J. Physiol.*, 181: 585, 1955.
6. Viault, E.: *Comp. rend.*, 112: 295, 1891.
7. Bert, P.: *La pression barométrique*. Masson Paris, 1878.
8. Prentice, T. C., y Mirand, E. A.: Some aspects of the relationship between plasma and urine erythropoietin. *Blood* 20: 505, 1962.
9. Reynafarje, C.: V Congreso Latino Americano de Ciencias Fisiológicas. Mesa redonda sobre eritropoyetina. Caracas, Agosto, 1963.
10. Hodgson, G., y Tohá, J.: The erythropoietic effect of urine and plasma of repeatedly bleed rabbits. *Blood*, 9: 299, 1954.
11. Stohman, Jr.: Observation on the physiology of erythropoietin and its role in the regulation of red cell production. *Ann. Acad. Sc.* 77: 719, 1959.
12. Mirand, E. A., Prentice, T. C., y Slaunwhite, W. R.: Current studies on the role of erythropoietin on erythropoiesis. *Ann. Acad. Sc.*, 77: 698, 1959.
13. Ichihyanagi, S.: La eritropoyetina en algunas hemopatías (Leucemia y Talasemia). Tesis Br., 1963.
14. Rodríguez, N.: Factor eritropoyético urinario en anemia aplásica. Tesis Br., 1963.
15. Stohman, F. Jr., Rath, C. E., y Rose, J. C.: Evidence for a humoral regulation of erythropoiesis. *Blood*, 9: 721, 1954.

16. Merino, C.: Plasma erythropoietic factor in the polycythemia of high altitudes. School of Aviation Medicine, USAF. Report N° 56: 103. 1956.
17. 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.
18. Wintrobe, M. M.: Clinical Hematology. Lea Febiger. Phyladelphia, 1961.
19. Hurtado, A., Merino, C., y Delgado, E.: Influence of anoxemia on the the hemopoietic activity. Arch. In. Med. 75: 284. 1945.
20. Weinstein, I. M.: Mechanisms of Anemia. ed. N. Y. Mc. Graw Hill book Company. 1962.
21. Tocantins, L. M.: Progresos en Hematología. ed. Científico Médica. 1961.
22. Scaro, J. L.: Actividad eritropoyética del extracto urinario de sujetos residentes en la altura. Rev. Soc. Arg. Biol., 36: 1, 1960
23. Reynafarje, C.: The influence of high altitude on erythropoietic activity. Brookhaven Symposia in Biology. Brookhaven Nat. Lab. N° 10, 1957.