

FACTOR ERITROPOYETICO URINARIO EN ANEMIA APLASTICA *

NICANOR U. RODRÍGUEZ TAPIA

Carnot y Deflandre, en 1906, fueron los primeros investigadores que se ocuparon del estudio del factor humoral, al que le llamaron hemopoyetina; posteriormente se hicieron trabajos experimentales en animales por medio de sangría y descenso de la presión barométrica, lo cual sugiere que el estímulo se produciría por estas causas.

Más tarde, Reissman (1), en sus experiencias encuentra que la hipoxia por un mecanismo humoral estimula la eritropoyesis.

Stohlman (2), y otros, en pacientes con ductus arteriosus, hicieron un estudio sobre la saturación y tensión de oxígeno, apoyando el mecanismo antes citado.

En 1953, Erslev (3) transfundió plasma anémico a receptores normales obteniendo reticulocitosis (6 al 10%) y una elevación significativa del hematocrito.

Van Dyke (8) estudio este factor en varios casos clínicos de anemia, encontrando positivos en algunos casos de anemia aplástica.

Estos hechos nos sugirieron realizar el presente estudio sobre la eritropoyetina, que por primera vez se hacen en anemia aplástica en nuestro medio, con el fin de contribuir al mejor conocimiento de este problema, que está en las primeras etapas de su estudio.

El problema de eritropoyetina y algunos casos patológicos ha sido estudiado en equipo por seis alumnos de la Facultad de Medicina de San Fernando, en el Instituto de Biología Andina, dirigidos por el Dr. César Reynafarje; habiéndome correspondido ocuparme sobre eritropoyetina urinaria en Anemia Aplástica.

MATERIAL Y METODOS

El método empleado para esta investigación ha sido el que se describe en este capítulo.

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

1. Material humano

- (a) Dos pacientes con anemia aplásica: Uno del Hospital del Empleado y otro del Hospital "Dos de Mayo"; se colectó la diuresis de 24 horas y se preparó el extracto urinario.
- (b) Seis alumnos de la Facultad de Medicina de San Fernando, residentes en Lima, se colectó el volumen total de la diuresis de 24 horas, en una cantidad de 1,000 cc. y se preparó el extracto urinario.

2. Material animal

Ratas blancas menores de tres meses con un peso promedio de 150 gramos cada una. Utilizamos tres grupos de ratas.

- (a) Grupo de siete ratas blancas para el extracto urinario de nivel del mar (control).
- (b) Grupo de cinco ratas blancas para el extracto urinario del paciente con anemia aplásica del Hospital del Empleado.
- (c) Grupo de cuatro ratas blancas para el extracto urinario del paciente con anemia aplásica del Hospital "Dos de Mayo".

Fueron colocadas para el ayuno de cuarenta y ocho horas antes de comenzar el experimento.

Instrumental

- (a) Jeringas hipodérmicas de 10 cc. con agujas especiales para la inyección intraperitoneal.
- (b) Material para la extracción de sangre con jeringa heparinizada de 5 cc. y previa anestesia de la rata con éter.

3. Método de preparación del extracto urinario

La orina se guarda en refrigeradora inmediatamente después de emitida.

En lo posible trabajar con centrifuga refrigerada y tener las soluciones en las mismas condiciones.

Preparación

A partir de 300 cc. de orina.

Centrifugar 10 minutos. Separar el sedimento. Se puede también filtrar con papel de filtro grueso.

Tomar el pH. Llevar el pH. a 4.5 con ácido acético 0.5 M. (se necesitan alrededor de 10 cc. para 300 cc. de orina). Medir el volumen de ácido y sumarlo a los cc. de orina. El resultado multiplicarlo por cuatro. Este será el volumen de alcohol etílico a emplearse por ejemplo:

$$300 + 10 = 310 \times 4 = 1,240$$

Agregar el alcohol etílico agitando lentamente la orina.

Dejar reposar dos horas como mínimo y hasta 20 horas como máximo en congeladora.

Aparece un precipitado blanco.

Se agita la orina hasta homogenizar y se centrifuga durante 20 minutos a 3,500 r.p.m.

Se descarta el sobrenadante, escurriendo bien el alcohol. Se puede colocar el tubo de centrifuga boca abajo.

El precipitado seco se disuelve en buffer fosfato ácido de sodio 0.01 M. (de 10 a 20 ml.)

Centrifugar 30 minutos a 2,000 revoluciones. Separar el sobrenadante y guardarlo congelado.

Este sobrenadante se inyecta intraperitonealmente en ratos ayunados los días tercero y cuarto, al quinto día se inyecta 1 cc. de solución de Fe 59 por la misma vía. A las 24 horas se sacrifica al animal.

Reactivos

Alcohol etílico de 96°.

Acido acético 0.5 M.: Medir 14 ml. de ácido acético glacial, completar a 500 ml. con agua destilada. Guardar en congeladora.

4. Método de preparación del buffer

Fosfato ácido de sodio 0.1 M. Se pesan 3,560 gramos, con 12 moléculas de agua. Se completa a 100 ml. disolviendo con agua destilada tibia. Esta es la solución madre para usarla, disolver 1 ml. en 10 ml. de agua destilada.

5. Determinación de la hemoglobina

- Se coloca 20 cm. de sangre en tubos de ensayo que contenga 10 cc. de agua destilada.
- Se agrega 1 ó 2 gotas de amaniaco.
- Prevía agitación se hace la lectura en el Fotocolorímetro de Evelyn. Los resultados obtenidos se convierten por medio de tablas especiales.

6. Preparación de la solución de Fe 59

- Se toma 11 cc. de agua destilada y se añade 0.5 cc. de solución de citrato de Fe 59. (Tiempo de vida media 47 días).
- De esta solución se toma 1 cc. para cada rato.

7. Preparación del standard de Fe 59

Se toma 1 cc. de la solución del preparado anterior (Nº 6) y se agrega 100 cc. de agua destilado, quedando una solución al 1%.

8. Lectura en el contador de Geiger Muller

Para tomar las cuentas de incorporación del Fe 59 hemos seguido el siguiente procedimiento:

- Se toma 1 cc. de la sangre extraída y se coloca en tubos de Vial para efectuar las cuentas.
- Se toma la lectura del B.G. (radioactividad del medio ambiente).
- Lectura del Standard del Fe 59 (de 1 cc.).
- Lectura de las muestras.

9. Fórmula para el cálculo del porcentaje de incorporación de Fe 59

Cuentas netas por 64 = X

X — B.G. = X₂

X₂ X Vol. total de sangre (5% del peso de cada rata) = X.

$$\frac{X_3}{St.} = \% \text{ de incorporación de Fe 59.}$$

10. Métodos estadísticos

Fórmulas empleadas para el cálculo del porcentaje de incorporación de Fe 59 y determinación de hemoglobina gramos por ciento.

$$V_1 = \frac{\text{suma de } X}{n} = \text{Media}$$

$$V_2 = \frac{\text{Suma de } X^2}{n} = \text{Cuadrado de la media}$$

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

δ = Desviación Standard

$$\frac{\pi}{\text{Media}} = \text{C.V. \%}$$

$$\frac{\sqrt{(n-1)}}{\text{Desv. St.}}$$

Desv. St.

$$\frac{\text{Desv. St.}}{\sqrt{2(n-1)}} = \text{E.S. de la Desv. St.}$$

$$\text{Media} \pm \text{E.S.} = V_1 \pm \text{E.S. de la Media}$$

$$\text{Desv. St.} \pm \text{E.S.} = \text{Desv. St.} \pm \text{E.S. de la Desv. St.}$$

Coefficiente de Variación

Valores extremos

Resumen de la historia clínica del paciente con anemia aplásica del Hospital del Empleado

Paciente de 20 años, sexo masculino, ocupación vendedor de una zapatería, ingresa al hospital por las molestias principales de: petequias, hemorragias y fiebre; dos días antes de su ingreso gingivorragia, melena, visión borrosa y vértigos. Al examen clínico: gran palidez en piel y mucosas, petequias en todo el cuerpo; no hay hepato-esplenomegalia. Temperatura 39°, pulso 120 por minuto, presión arterial 130/50. Los análisis de laboratorio: Hb. 3.2 grs.%, hematíes 1'950,000; plaquetas 48,000; leucocitos 2,700; hematocrito 25%.

El examen de la médula ósea indica hipoplasia medular. Con el tratamiento a base de transfusiones sanguíneas, vitaminas, corticoides, aumentó su nivel hemático.

Resumen de la historia clínica del paciente con anemia aplásica del Hospital Dos de Mayo

Paciente que ingresa el 15 de mayo de 1963. Edad: 23 años. Ocupación: obrero. Natural de Huancavelica de donde procede. Presenta gingivorragias, hematomas a los pequeños traumatismos; dolor intenso en hipocondrio izquierdo, nota en ambos brazos sufusiones sanguíneas que se han ido extendiendo a todo el cuerpo. Micropoliadenia generalizada. Al examen clínico gran palidez de piel y mucosas, manchas rojas en todo el cuerpo. Hepato-

esplenomegalia. Análisis de laboratorio seriados: La Hb. entre 3.8-3.2 gramos por ciento. Hematíes 1'470,000, leucocitos 2,600, hematocrito 17%, plaquetas 50,000. El examen de la médula ósea: Anemia Aplástica.

Ensayos en animales de experimentación

Experimento N° 1. Se estudió un grupo de siete ratas blancas a las cuales se les inyectó 4 cc. intraperitonealmente de extracto urinario de sujetos de nivel del mar, en 24 horas (2 cc. en la mañana y 2 cc. en la tarde). Las ratas fueron ayunadas 48 horas antes del inicio de la prueba. La aplicación se hizo durante tres días, el tercer día por la tarde se inyecta por la misma vía 1 cc. de solución de Fe 59, 24 horas después se sacrificó anestesiándola previamente con éter; haciéndole punción cardíaca se obtuvo un promedio de 2 cc. de sangre e inmediatamente se hace la lectura de la hemoglobina y la incorporación de Fe 59, con las técnicas indicadas anteriormente cuyos resultados están referidos en la Tabla N° 1.

Experimento N° 2. Se utilizaron ratas blancas a las que se inyectó intraperitonealmente 4 cc. diarios de extracto urinario de un paciente con anemia aplástica del Hospital del Empleado (2 cc. en la mañana y 2 cc. en la tarde). El tercer día por la tarde se le aplica 1 cc. de solución de Fe 59 por la misma vía y 24 horas después se sacrificó siguiendo el mismo procedimiento anterior, se obtuvo los resultados que se indican en la Tabla N° 2.

Experimento N° 3. Se ensayó con cuatro ratas blancas inyectándoles intraperitonealmente 4 cc. de extracto urinario de un paciente con anemia aplástica del Hospital Dos de Mayo, el tercer día por la tarde se aplica 1 cc. de solución de Fe 59 por la misma vía, 24 horas después se sacrifica al animal siguiendo los procedimientos anteriores y los resultados se indican en la Tabla N° 3.

Tabla N° 1. Determinaciones del porcentaje de incorporación del Fe 59 y de hemoglobina de las ratas que recibieron 4 cc. de extracto urinario de nivel del mar

	Media \pm E.S.	Desv. St. \pm E.S.	C.V. %	Val. Ext.
Incorporación Fe 59 %	6.08 \pm 1.06	2.61 \pm 0.75	4.29	10.27 - 2.4
Hemoglobina gr. %	13.68 \pm 0.098	0.24 \pm 0.069	1.75	14.80 - 12.70

RESULTADOS

Como resultado de las experiencias hemos obtenido un incremento de la incorporación de Fe 59 en los casos estudiados:

Del Hospital del Seguro Social del Empleado, una media de 13.84 \pm 2.38 de E.S.; con relación a las de control que fue una media de 6.08 \pm 1.06 de E.S. (Ver Tabla N° 4). Hacemos notar que hay una diferencia de la media de 7.76.

Los casos del Hospital Dos de Mayo con una media de 24.05 \pm 5.62 de E.S.; con relación a las de control de 6.08 \pm 1.06. Siendo una diferencia de la media de 17.97.

Observamos el porcentaje de incorporación de Fe 59 en los casos estudiados del Hospital del Seguro Social del Empleado un 50% más elevado que las de control.

En los casos del Hospital Dos de Mayo un incremento de cuatro veces más que las de control.

Tabla N° 2. Determinaciones del porcentaje de incorporación de Fe 59 y de hemoglobina de las ratas inyectadas con extracto urinario del paciente con Anemia Aplásica del Hospital del Seguro Social del Empleado

	Media \pm E.S.	Desv. St. \pm E.S.	C.V. %	Val. Ext.
Incorporación Fe 59	13.84 \pm 2.38	4.76 \pm 1.68	3.44	20.50—7.90
Hemoglobina gr. %	15.36 \pm 0.77	1.54 \pm 0.54	10	17.00—12.80

DISCUSION

Con estos resultados de incremento de incorporación de Fe 59 en los casos de Anemia Aplásica del Hospital del Seguro Social del Empleado y del Hospital Dos de Mayo, con respecto a las de control, se demuestra claramente el estímulo del factor eritropoyético urinario.

Hacemos notar que los resultados de la hemoglobina anotados en las tablas 1, 2 y 3 las tomamos tan sólo como referencia, ya que esta dosificación fue hecha hace tres días, después de la inyección de extracto urinario; período de tiempo muy corto para pensar que la síntesis de hemoglobina haya sido incrementada.

Tabla N° 3. Determinaciones del porcentaje de incorporación de Fe 59 y de hemoglobina de las ratas inyectadas con extracto urinario del paciente con Anemia Aplásica del Hospital Dos de Mayo

	Media \pm E.S.	Desv. St. \pm E.S.	C.V. %	Val. Ext.
Incorporación Fe 59	24.05 \pm 5.62	9.73 \pm 3.99	4.05	38.30—11.70
Hemoglobina grs. %	15.25 \pm 0.68	1.19 \pm 0.48	7.78	17.30—14.40

Gurney (4) y sus colaboradores estudiaron tres casos, dos con hipoplasia idiopática y uno con hipoplasia producida por medicamentos, encontraron aumentada la eritropoyetina, observando un aumento en la incorporación de Fe 59 y presumiblemente un aumento de la síntesis de hemoglobina en las ratas que recibían extractos alcohólicos o desnaturalizados por el calor, de pacientes con síntomas clínicos diversos inclu-

yendo la anemia perniciosa, la pérdida de sangre o la anemia hemolítica y anemia aplástica.

Rambach (5) en sus conclusiones refiere que algunos pacientes con anemia aplástica excepcionalmente presentan niveles elevados de actividad eritropoyética en el plasma. La orina de los mismos fue ensayada y en algunos casos la potencia fue equivalente a la del plasma.

Reynafarje (6) sugiere que en los mecanismos reguladores de la absorción de hierro debe tomar un lugar de íntima relación con el mecanismo similar que controla la eritropoyesis.

Tabla N° 4. Cuadro Comparativo del porcentaje de incorporación de Fe 59 de: extracto urinario a nivel del mar (control), de Anemia Aplástica del Hospital del Empleado y Dos de Mayo, respectivamente

	Media \pm E.S.	Desv. St. \pm E.S.	C.V. %	Val. Extremos
Control	6.085 \pm 1.06	2.61 \pm 0.75	4.29	10.70 — 2.40
A.A.H.E.	13.84 \pm 2.38	4.76 \pm 1.68	3.44	20.50 — 7.90
A.A. D.M.	24.05 \pm 5.62	9.73 \pm 3.99	4.05	38.30 — 11.70

Stohlman (2) Linman (7) en animales anémicos e hipóxicos con hipoplasia medular inducida por radiación, encuentran altos títulos de eritropoyetina y la más lenta desaparición de la misma. Estas experiencias nos demuestran que la actividad eritropoyética se encuentra aumentada cuando la médula ósea está hipoplástica. La eliminación de eritropoyetina urinaria de pacientes y de animales con anemias intensas lo han demostrado varios autores, Van Dyke (8), Winkert (9).

Van Dyke (8) en sus experiencias en normales y variedad de pacientes con alteraciones hematológicas (anemia aplástica) ensayó la actividad eritropoyética plasmática, encontrando una diferencia del porcentaje de incorporación de Fe 59 de cuatro a cinco veces más que los normales, con esta elevación en plasma fue lo que decidió para el ensayo en orina. Un milímetro de extracto urinario era tan alta la actividad eritropoyética e incremento de la incorporación de Fe 59 como la de 1 milímetro de plasma en 16 horas. Encontraron similares resultados que son comparativamente a los que hemos hallado nosotros. Refiere que en cierto grupo de pacientes con anemia aplástica producen y eliminan gran cantidad de sustancia eritropoyética porque la médula ósea se halla alterada.

CONCLUSIONES

1. Los pacientes de Anemia Aplástica estudiados presentaron un incremento apreciable del factor critropoyético en orina.
2. Estos hallazgos confirman las investigaciones anteriores que revelaron la presencia de este factor en la orina.
3. Parece haber relación entre el grado de anemia y el factor eritropoyético urinario.
4. Los métodos para la obtención del extracto urinario y de la incorporación de Fe 59 fueron satisfactorios.

BIBLIOGRAFIA

1. Reissman, K.R.: The mechanism of erythropoietic stimulation in parabiotic rats during hipoxia. *Blood*. 5: 372, 1950.
 2. Stahlman, F., Jr.; Roth, C.E. y Rose, J.C.: Evidence for a humoral regulation of erythropoiesis. *Blood*. 9: 721, 1954.
 3. Erslev, A.: Humoral regulation of red cell production. *Blood*. 8: 349, 1953.
 4. Gurney, G.W.; Goldswasser, E y Pan, C.: Studies on erythropoiesis. VI. Erythropoietin in human plasma. *J. Lab. & Clin. Med.* 50: 534, 1953.
 5. Rambach, W.A.; I LT., H.L. Cooper, J,A,D,: *Blood*, 1957, V12, 101.
 6. 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.
 7. Linman, J.W. and Bethell, F.H.: The effect of irradiation on the plasma erythropoietic stimulating factor. *Blood*. 12: 123, 1957.
 8. Van Dyke, D.C.; J.F. and Lawrence, J.H.: Concentration of highly potent erythropoietic activity from the urine of anemic patient. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.* 96: 541, 1947.
 9. Winkert, J.; Gordon, A.S.; Piliero, S.J. and Medicine, P.T.: Partial purification of urinary erythropoietin. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.* 98: 351, 1958.
 10. Wintrobe, M.M.: *Clinical hematology*. Ed. 5 Phyladelphia Leo. J. Febiger. 1961, cap. 3.
 11. Pérez Enciso, J.: Tesis (Br.) Factor eritropoyético urinario y plasmático en hipoxia crónica de altura.
 12. Farfán Oviedo, A.: Tesis (Br.) Hipoxia aguda y su relación con el factor eritropoyético.
 13. Manrique, N.: Tesis (Br.) Posibles mecanismos en la producción de la policitemia del cobalto y en la depresión medular de los nativos que son trasladados a nivel del mar.
 14. Ichiyonagi, S.: Tesis (Br.) La eritropoyetina en algunas hemopatías (Leucemia y Tala-semia).
-