

**EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE ERITROPOYETINA Y  
ACTIVIDAD PLAQUETARIA EN PACIENTES CON ANEMIA  
FERROPÉNICA Y TROMBOCITOSIS**

**CLAUDIA EMILCE CIFUENTES LÓPEZ  
MARTHA LUCIA MEIJUEIRO OROZCO**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
CARRERA DE BACTERIOLOGÍA  
BOGOTA D.C.  
2002**

**EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE ERITROPOYETINA Y ACTIVIDAD  
PLAQUETARIA EN PACIENTES CON ANEMIA FERROPÉNICA Y  
TROMBOCITOSIS**

**CLAUDIA EMILCE CIFUENTES LÓPEZ  
MARTHA LUCIA MEIJUEIRO OROZCO**

**TRABAJO DE GRADO**

**Presentado como requisito parcial para optar al título de**

**BACTERIOLOGA**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**CARRERA DE BACTERIOLOGÍA**

**BOGOTÁ D.C.**

**2002**

**EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE ERITROPOYETINA Y ACTIVIDAD  
PLAQUETARIA EN PACIENTES CON ANEMIA FERROPÉNICA Y  
TROMBOCITOSIS**

---

**Viviana Marcela Rodríguez Pardo MSc.  
Director**

---

**Aura Rosa Manascero  
Asesor**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
CARRERA DE BACTERIOLOGÍA  
BOGOTA  
2002**

**EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE ERITROPOYETINA Y ACTIVIDAD  
PLAQUETARIA EN PACIENTES CON ANEMIA FERROPÉNICA Y  
TROMBOCITOSIS**

---

---

**Adriana Cadena Bact Esp.**

**Claudia Fajardo Bact Esp.**

**JURADO**

**JURADO**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
CARRERA DE BACTERIOLOGÍA  
BOGOTA D.C.  
2002**

**EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE ERITROPOYETINA Y ACTIVIDAD  
PLAQUETARIA EN PACIENTES CON ANEMIA FERROPÉNICA Y  
TROMBOCITOSIS**

---

**Angela Umaña Ph.D**  
**Decano Academico**

---

**Aura Rosa Manascero**  
**Directora de Carrera de Bacteriología**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**CARRERA DE BACTERIOLOGÍA**  
**BOGOTA D.C.**  
**2002**

### **NOTA DE ADVERTENCIA**

Artículo 9.18 del reglamento de los trabajos de grado y de investigación, agosto de 1989: “Los criterios expuestos, las opiniones expresadas y las conclusiones anotadas son responsabilidad del autor y no comprometen a la Pontificia Universidad Javeriana”

*A Dios el ser que me dio la vida, que siempre me acompaña, me alienta, me da entendimiento y seguridad.*

*A mi Madre Estrellita quien fue y ha sido guía, apoyo y compañía para poder cumplir todos mis sueños y metas profesionales.*

*A mi Padre Jesús, mis hermanos Oscar y Zulenny y a mis sobrinos Diego y Jhouzy quienes fueron una voz de aliento y el motivo de una sonrisa en cada instante difícil de mi vida.*

*A mi esposo Arturo quien pacientemente supo entender todos los momentos de ausencia, dificultades y frustraciones, además comprendió que el vacío que yo dejaba en nuestro hogar era el esfuerzo y sacrificio encaminado a forjar un mejor futuro para nuestras vidas.*

*A nuestra directora de trabajo de grado Viviana Rodríguez quien con su profesionalismo supo brindarnos su experiencia y conocimiento; Sin su orientación este trabajo que hoy entregamos a ustedes no hubiese sido tan satisfactorio.*

*A mis compañeras y amigas y en especial a Martha Lucia quien trabajo hombro a hombro, con dedicación y empeño para lograr este triunfo que hoy hace que seamos profesionales.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradecemos la colaboración prestada para este estudio del Centro Javeriano de Oncología, al Dr. Tomás Wilde, a la Dra Jorleth Agudelo por el procesamiento de las pruebas de agregometria plaquetaria; al laboratorio de Hematología Especial del Hospital Militar Central Teniente Coronel Pedro Merchán y a la Dra Beatriz Amaya y al Instituto de Seguros Sociales PAIBA a la Dra Aura Maria Sánchez por la ayuda prestada en la recolección de las muestras.

Agradecemos la dedicación y el empeño de nuestra directora de tesis Dra. Viviana Rodríguez Pardo y la asesoría prestada por la Dra Aura Rosa Manascero

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>Pág</b>
RESUMEN	
1. INTRODUCCIÓN .....	8
2. REVISION DE LITERATURA.....	10
2.1 Generalidades.....	10
2.2 Metabolismo del Hierro.....	14
2.3 Anemia Ferropénica .....	18
2.3.Sintomatología de la Anemia Ferropénica .....	20
2.3.2 Diagnóstico por Laboratorio de Anemia Ferropénica.....	21
2.4 Eritropoyetina.....	23
2.4.1 Estructura Molecular .....	24
2.4.2 Síntesis.....	25
2.4.3 Receptores de Eritropoyetina y Distribución Celular .....	27
2.4.4 Relación de la Eritopoyetina con la Trombopoyesis.....	28
2.5 Trombopoyesis.....	29
2.5.1 Etapas de Desarrollo.....	29
2.5.2 Factores Solubles Estimuladores de Crecimiento.....	31
2.5.3 Evaluación de la Actividad Plaquetaria en el Laboratorio .....	32

2.6 Relación entre Anemia Ferropénica, Trombocitosis y Riesgo Protrombotico.....	36
3. JUSTIFICACIÓN.....	40
4. OBJETIVOS.....	42
4.1 Objetivo General.....	42
4.2 Objetivos Específicos.....	42
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	43
5.1 Tipo de Estudio.....	43
5.2 Hipótesis.....	43
5.3 Población de Referencia.....	43
5.4 Población de Estudio.....	43
5.5 Métodos.....	45
5.5.1 Cuadro Hemático Automatizado.....	47
5.5.2 Frotis de Sangre Periférica (FSP).....	47
5.5.3 Sideremia.....	47
5.5.4 Capacidad de Fijación del Hierro a la Transferrina (TIBC).....	49
5.5.5 Agregometria Plaquetaria.....	51
5.5.6 ELISA para la Cuantificación de Eritropoyetina.....	52
5.5.7 Determinación de Colesterol de Baja Densidad (LDL).....	55
6. RESULTADOS.....	56
6.1 Análisis Estadístico.....	56
6.2 Niveles de Hematocrito y hemoglobina.....	57
6.3 Frotis de Sangre Periférica.....	58

6.4 Evaluación de los Niveles de Hierro Sérico .....	59
6.5 Agregometria Plaquetaria.....	60
6.6 Niveles Séricos de Eritropoyetina.....	62
6.6.1 Niveles Séricos de Eritropoyetina y Recuentos Plaquetarios.....	62
6.7 Colesterol de Baja Densidad LDL.....	63
7. DISCUSIÓN .....	65
8. CONCLUSIONES .....	68
9. RECOMENDACIONES.....	69
10. BIBLIOGRAFÍA	
11. ANEXOS	
ANEXO 1.....	70
ANEXO 2.....	71
ANEXO 3.....	72
ANEXO 4.....	73
ANEXO 5.....	74
ANEXO 6.....	75
ANEXO 7.....	76

## RESUMEN

Antecedentes experimentales y evidencias clínicas han permitido observar que pacientes que padecen de anemia por deficiencia de hierro pueden presentar recuentos plaquetarios elevados posiblemente por un efecto compensatorio de la eritropoyetina. Durante el año de 1996 el grupo del doctor Akins, mostró que ciertos pacientes que cursan con anemia ferropénica y trombocitosis simultánea, sin antecedentes de enfermedad arteriosclerótica o dislipidemias, pueden desarrollar trombos en vasos sanguíneos, lo que aumenta el riesgo de desarrollar una trombosis arterial y por consiguiente un accidente cerebro-vascular. Basándonos en las revisiones bibliográficas nuestro estudio pretende investigar los niveles de eritropoyetina en pacientes con anemia ferropénica para conocer si existe una relación directa entre los niveles de la hormona y el desarrollo de trombocitosis reactiva, así como evaluar las posibles alteraciones funcionales en las plaquetas presentes en los pacientes incluidos en el estudio.

Los datos experimentales mostraron una relación directa entre los niveles de eritropoyetina y recuentos plaquetarios. Los niveles de TIBC y sideremia confirmaron los criterios de inclusión de la población que acoge

pacientes con diagnóstico presuntivo de anemia ferropénica; se observó alteraciones en la agregación con epinefrina en dos pacientes del estudio.

Además se observa que nuestra población (32 individuos) presenta recuentos plaquetarios elevados posiblemente como consecuencia del aumento fisiológico de la eritropoyetina. Adicionalmente la trombocitosis con anemia ferropénica que presentan nuestros pacientes revelan que no hay factores de riesgo protrombóticos sino más bien alteraciones en la agregación plaquetaria lo que podría conducir a procesos hemorrágicos a pesar de los recuentos elevados

## 1. INTRODUCCIÓN

La anemia ferropénica es una patología de alta incidencia a nivel mundial que afecta principalmente a la población infantil como consecuencia de una nutrición deficiente durante el periodo de crecimiento; también se presenta en la población adulta a causa de hemorragias crónicas, neoplasias, déficit dietario y aumento de la demanda durante el embarazo. El establecimiento de esta patología se da como resultado de tres etapas consecuentes, siendo estas: *Depleción Inicial de Depósitos de Hierro, Eritropoyesis Ineficiente y Anemia Ferropénica Establecida*. (Gualandro, S. 2000; Oski, F. 1993; Andrews, N. 1999; Freire, W. 1998)

Estudios clínicos muestran que además de las alteraciones que se presentan en la morfología eritrocitaria, los pacientes que cursan con anemia ferropénica pueden mostrar compromiso de los recuentos plaquetarios que se pueden incrementar hasta  $1'000.000/\text{mm}^3$ , generando una trombocitosis reactiva; en donde la eritropoyetina parece que juega un papel importante en su etiología. Este incremento de plaquetas ha permitido observar que algunos pacientes puede desarrollar procesos tromboticos teniendo solo de base la anemia ferropénica y trombocitosis sin ninguna otra patología asociada. Akins y colaboradores así como Seibert y su grupo presentan casos clínicos en donde mujeres sin presencia de ateromas, que cursan con anemia por deficiencia de hierro y

trombocitosis simultáneamente, desarrollan trombos en la arteria carótida. (Cook, J. y cols, 1987. Borelli, G. y cols. 2001. Oyarzabal y cols. 1995, Karpatkin, S. y cols. 1974, Fiedberg, N. y cols. 1988, Akan, H. y cols.2000; Akins, P. y cols. 1996; Seibert, CE. 1975).

Con base en las revisiones acerca de este tema, nuestro estudio pretende evaluar los niveles de eritropoyetina y actividad plaquetaria en pacientes que cursan con anemia ferropénica y trombocitosis. Ya que la eritropoyetina esta posiblemente implicada en los cambios que se presentan en los recuentos plaquetarios; de igual manera el estudio de actividad plaquetaria nos permite observar cualitativamente la funcionalidad de estas células.

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Generalidades

La anemia es un síndrome producido por varias causas que no solo afectan a personas de escasos recursos como consecuencia de las parasitosis y del estado nutricional, sino que también puede afectar estratos económicos altos y compromete a todo tipo de edades. La presencia del síndrome anémico suele ser tratado con diferentes medicamentos dependiendo su etiología (sulfato ferroso, vitamina B12 y/o ácido fólico), que en algunos casos no permite encontrar la causa de la enfermedad. El estado anémico corresponde a la disminución de la concentración de hemoglobina en sangre y la masa eritrocitaria por lo cual el transporte de oxígeno a los tejidos se ve afectado; este puede ser originado por alguna patología de base que puede ser debida a diferentes causas; la más común es la anemia por deficiencia de hierro siendo muy frecuente a nivel mundial afectando a millones de personas en el mundo.

Las anemias clínicamente pueden ser clasificadas de acuerdo a:

(Tabla 1) (Villanueva, J. 2000, Gualandro, S. 2000)

#### 1. Morfología eritrocitaria:

- ? Microcíticas e hipocrómicas: caracterizadas por un VCM < 80fl, HCM < 28 pg y CHCM < 31g/dl.

- ? Macrocíticas, normocrómicas o hipocrómicas caracterizadas por un VCM >100fl, HCM >32 pg y un CHCM >36g/dl.
- ? Normocíticas, normocrómicas: caracterizada por un VCM de 80 a 99 fl, HCM de 28 a 32 pg y un CHCM de 31 a 36g/dl.  
(Villanueva, J. 2001; Wintrobe. 1994)

## 2. Etiología:

- ? Eritropoyesis ineficiente: Aplasia medular la cual puede ser adquirida (acción de agentes físicos) o congénita (Anemia de Fanconi)
- ? Carenciales: En este grupo se encuentran la anemia ferropénica y las causadas por deficiencia de vitamina B12 y Folatos.
- ? Hemolíticas: En este grupo de anemias encontramos anemias intracorporales como las talasemias y hemoglobinopatías y extracorporales como las causadas por anticuerpos, parásitos y medicamentos. (Villanueva, J. 2001; Wintrobe. 1994)

## 3. Presentación de síntomas:

- ? En las anemias crónicas se observa que el desarrollo de la enfermedad se desencadena de una forma progresiva, lo cual permite que el paciente que presente este tipo de anemia se adapte a tal condición. Esta situación se manifiesta en las

anemias carenciales como lo son la anemia por deficiencia de hierro o la anemia por deficiencia de ácido fólico y vitamina B12.

- ? Las anemias agudas se presentan en aquellos pacientes que desencadenan procesos hemorrágicos a corto plazo (normocíticas normocrómicas), en donde la presentación de los síntomas aparecen rápidamente. (Villanueva, J. 2001; Wintrobe. 1994)

Para el diagnóstico de las anemias es útil la implementación de ciertas pruebas especiales que son realizadas de acuerdo a la sintomatología del paciente y a la interconsulta clínica. En las anemias carenciales es útil la realización de un perfil de hierro, cuantificar vitamina B12 y ácido fólico, determinar la concentración de receptores de transferrina, determinar la cantidad hemoglobina reticulocitaria y el hemograma convencional en el cual podemos estudiar varios parámetros que nos pueden ayudar a determinar el estado anémico; en las anemias hemolíticas lo básico es la realización de una prueba de Coombs y un hemograma y en las anemias por falta de producción un estudio de médula ósea es lo indicado. (McKenzie, 2000; Abramson, S. 1999; Gualandro, S. 2000)





## 2.2 Metabolismo del Hierro

El hierro es requerido para realizar importantes funciones bioquímicas en todas las células del organismo. El adulto normal necesita un aporte de 35 a 45 mg de hierro por kilogramo de peso corporal, aunque las mujeres de 15 a 45 años y los niños en edad de crecimiento, necesitan mayores cantidades de hierro para su desarrollo. (Andrews, N. 1999; Frewin, R. 1997; Oski, F. 1993).

El contenido del hierro corporal puede ser de origen endógeno (destrucción fisiológica de eritrocitos) o exógeno (dieta). El hierro dietario (fuente exógena) puede encontrarse en estado férrico o ferroso; este último es absorbido directamente por los enterocitos duodenales, mientras que el hierro en estado férrico es reducido a su estado ferroso por la acción del ácido clorhídrico así como por enzimas ferrirreductasas, presentes en el borde apical de las células epiteliales del intestino (duodeno y yeyuno proximal) para facilitar su absorción; una vez el hierro se ha absorbido por transporte pasivo (ingesta elevada de hierro) o difusión facilitada (ingesta baja de hierro), atraviesa la célula enterocítica ayudado por una proteína transportadora de iones denominada DMT1 (Figura 1).

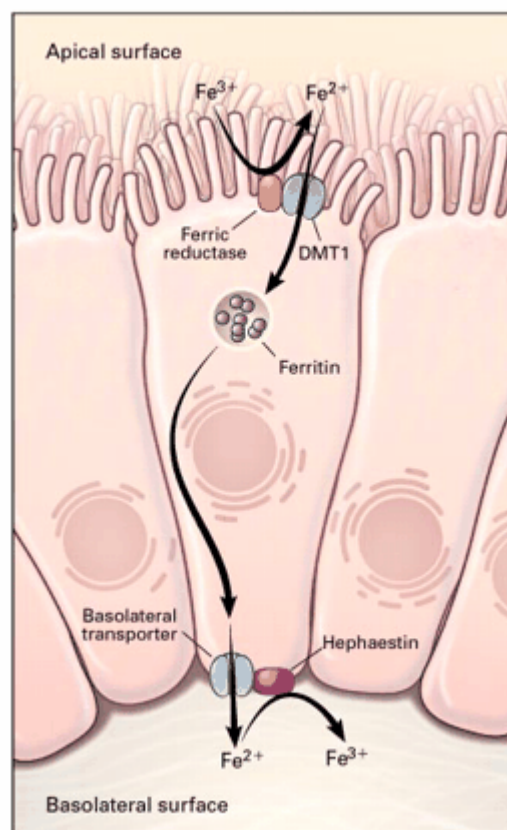


Figura 1. Absorción intestinal de hierro. El hierro en el proceso de absorción intestinal atraviesa las células epiteliales con la ayuda de una proteína transportadora de iones denominada DMT1.

Luego de atravesar el enterocito el hierro pasa a circulación porta donde es transportado por la transferrina plasmática para ser llevado a las células que lo requieran. Una vez el complejo transferrina-hierro llega a las células blanco, se une a los receptores de transferrina que se encuentran en la superficie celular, formando un complejo que es internalizado a la célula por un proceso de invaginación membranal que resulta en la formación de un endosoma; luego este endosoma es sometido a una descarga de  $[H^+]$  lo que permite una drástica disminución del pH que conduce al cambio conformacional de la transferrina,

permitiendo la liberación del hierro, el cual pasa al citoplasma de la célula blanco con la ayuda de otro transportador tipo DMT1; la transferrina junto con su receptor regresan a la superficie celular para su reutilización, mientras que el hierro se desplaza hacia la mitocondria para conformar la molécula de hemoglobina en los eritroblastos, la mioglobina en las fibras musculares y citocromos en otras células (Figura 2), o es almacenado en la células parénquimales del hígado y el bazo. (Andrews, N.1999; Roy, C. 2000; Frewin, R. 1997).

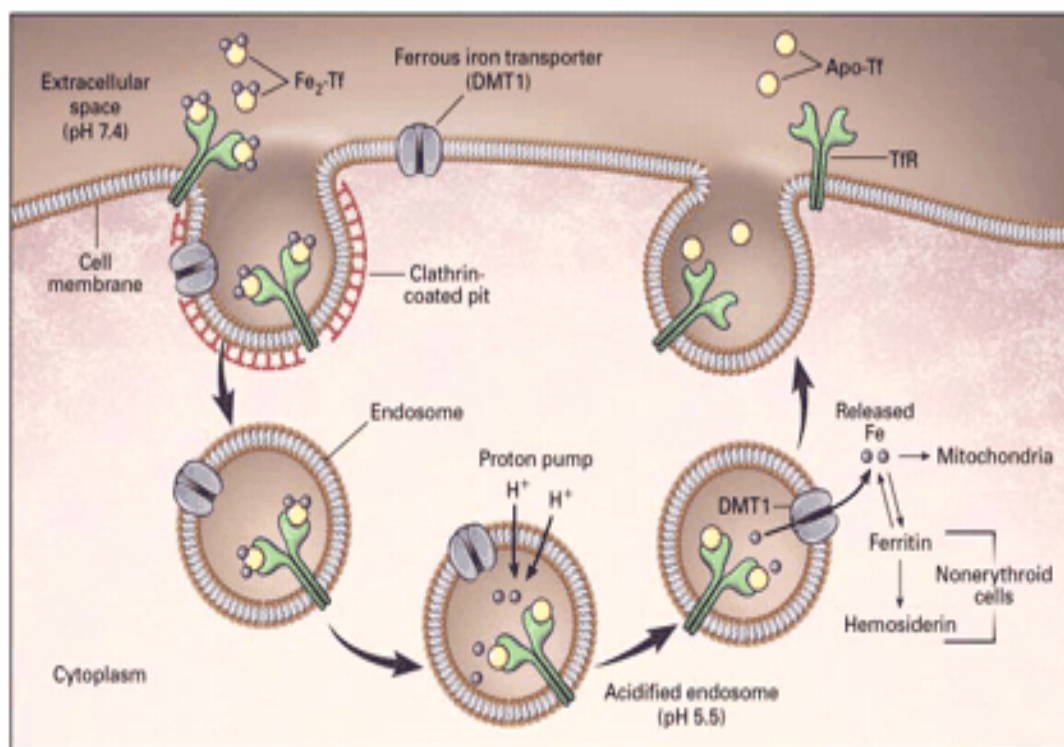


Figura 2. Rofeocitosis. Proceso de internalización del hierro a las células, se realiza por la acción de receptores de transferrina en la superficie celular, que se endocitan con el hierro y lo llevan hasta el compartimiento mitocondrial.

Además del origen exógeno, el hierro también se puede adquirir de reservas tisulares presentes en hígado, bazo y médula ósea y de la degradación de la hemoglobina contenida en los eritrocitos seniles en el sistema reticuloendotelial lo que permite la reutilización y redistribución del hierro en los diferentes compartimentos (Figura 3). (Andrews, N. 1999; Roy, C. 2000).

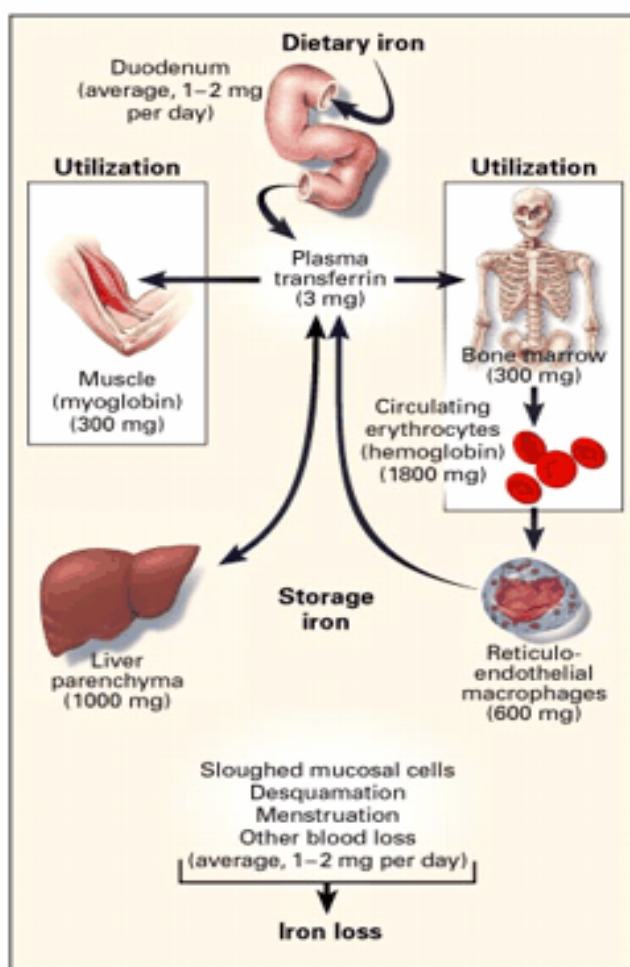


Figura 3. Localización del hierro en el organismo. El hierro es distribuido a las fibras musculares para la formación de la mioglobina, a médula ósea para la maduración celular eritroide y el hígado donde es mantenido como depósito. Se presentan pérdidas fisiológicas de hierro (1-2 mg) por descamación de las células mucosas y de la piel y por la menstruación.

### **2.3 Anemia Ferropénica**

La deficiencia de hierro ocurre como resultado del déficit en la ingestión de hierro, absorción defectuosa o aumento de la demanda, lo que puede ocasionar una patología establecida y denominada como Anemia Ferropénica, la cual se caracteriza por células pequeñas (microcíticas) y con un contenido de hemoglobina bajo (hipocrómicas). (Frewin, R. 1997; Beutler, E. 1988).

La deficiencia de hierro puede producirse por varias causas como el aumento en la pérdida de sangre (menstruaciones abundantes, sangrado digestivo) aumento de la demanda fisiológica (embarazo, lactancia y crecimiento), disminución en la absorción intestinal (diarreas, enfermedades digestivas y cirugías gastrointestinales) y alimentación deficiente. (Frewin, R. 1997).

La deficiencia de hierro se presenta gradualmente, reconociéndose tres fases:

1. Depleción Inicial de Depósitos de Hierro.
2. Eritropoyesis Ineficiente.
3. Anemia Ferropénica Establecida. (Figura 4).

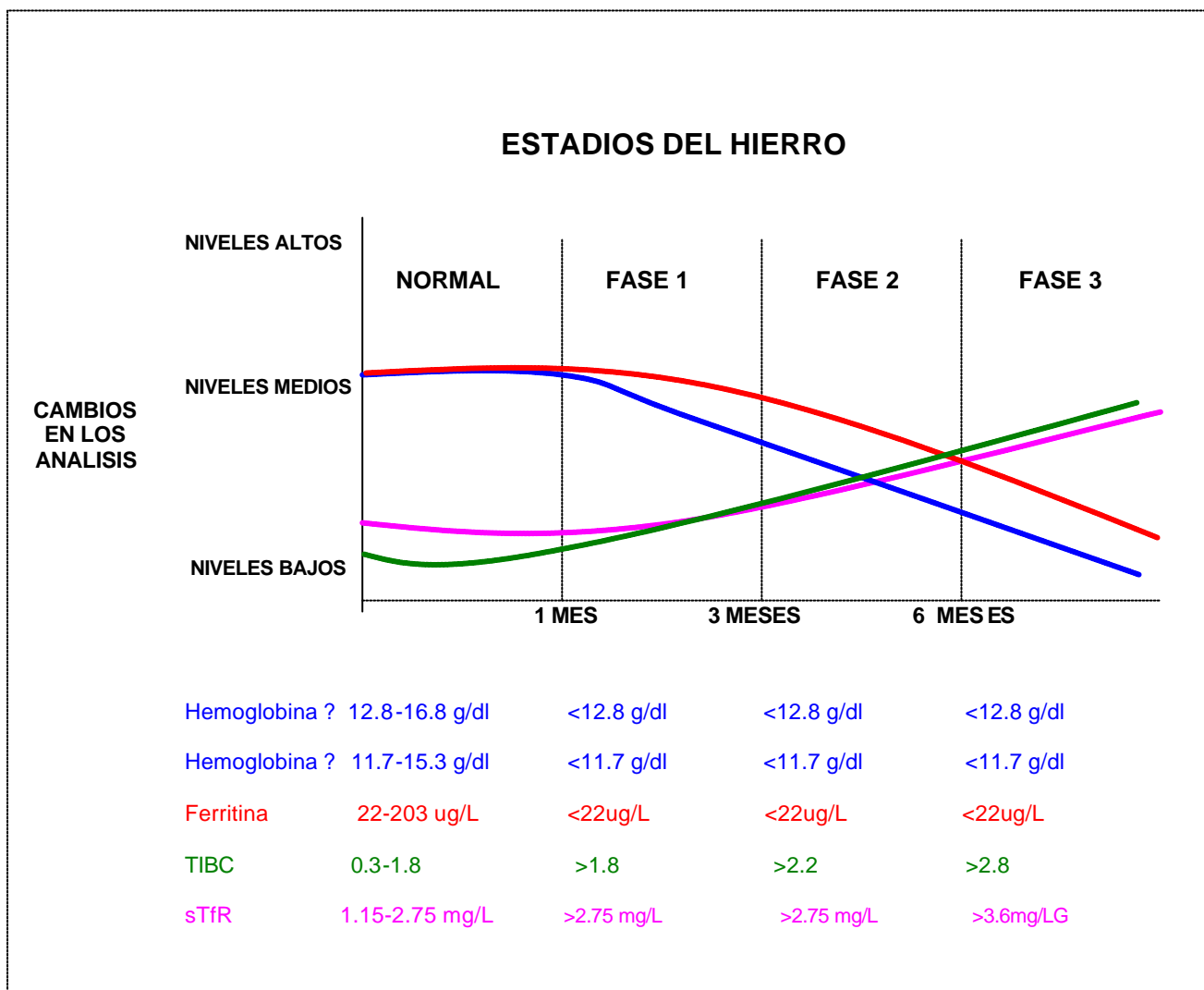


Figura 4. Etapas en la deficiencia de hierro. En la primera fase se disminuyen los parámetros hemáticos como la hemoglobina y el hematocrito. En la segunda fase se observa agotamiento en los depósitos de hierro y disminución tanto en la ferritina como del hierro sérico, provocando el aumento tanto del TIBC como del receptor soluble de transferrina (sTfR). En la última etapa se establece la anemia encontrándose alteraciones severas en los parámetros anteriormente descritos. (Oski, F. 1993, Suominen, P. 1998)

### **2.3.1 Sintomatología de la Anemia Ferropénica**

La anemia por deficiencia de hierro es una patología de alta prevalencia alrededor del mundo siendo la población más comprometida los niños con antecedentes de nacimiento prematuro, adolescentes, mujeres en edad reproductiva, ancianos, mujeres embarazadas y vegetarianos. (Szarfac, S. 1997; Frewin, R.1997).

En la anemia por deficiencia de hierro se presentan diferentes alteraciones a nivel sistémico que no son concretos para una sola enfermedad, entre estos encontramos:

Manifestaciones generales:

- ? Cansancio

Manifestaciones cardio-circulatorias:

- ? Palpitaciones
- ? Fatiga tras esfuerzos
- ? Tensión baja
- ? Inflamación de los tobillos

Manifestaciones neurológicas:

- ? Cefalea

- ? Vértigo
- ? Somnolencia, confusión, irritabilidad
- ? Tinnitus

Manifestaciones ginecológicas:

- ? Alteraciones menstruales

Manifestaciones en la piel:

- ? Palidez mucocutánea
- ? Alopecia
- ? Coiloniquia

(Frewin, R. 1997, Oski, F. 1993).

### **2.3.2 Diagnóstico por Laboratorio de Anemia Ferropénica:**

El diagnóstico de una anemia y su etiología se realiza con la ayuda de la historia clínica y algunos exámenes básicos de laboratorio como el hemograma. En éste puede observarse disminución en los valores de la hemoglobina (<11.7 g/dl en mujeres, <12.8 g/dl en hombres y en mujeres embarazadas <11.0 g/dl) el hematocrito y el recuento de glóbulos rojos. Adicional al hemograma, se pueden realizar pruebas complementarias como recuentos de reticulocitos, recuentos de plaquetas, donde se puede observar que algunos pacientes presentan recuentos elevados de estas últimas, ferritina disminuida en estadios avanzados ya que el organismo

toma las reservas de hierro cuando se presenta su deficiencia para seguir realizando la eritropoyesis, transferrina, índices hemáticos secundarios, como el VCM, CHCM y HCM se encuentran disminuidos reflejando microcitosis e hipocromia. Adicional a estos exámenes se pueden realizar otros estudios más específicos como la cuantificación de protoporfirina libre eritrocitaria la cual esta aumentada ya que su síntesis continúa en los precursores eritroides; la cuantificación de receptores solubles de transferrina que se encuentran elevados a partir del segundo estadio del proceso de depleción de hierro, siendo el primer indicador de la eritropoyesis ineficiente por la deficiencia de hierro y la hemoglobina reticulocitaria que es también un indicador temprano de eritropoyesis restringida por hierro. (Frewin, R. 1997, Beutler, E. 1988, Suominen, P. 1998, Brugnara, C. 1999).

En el frotis de sangre periférica, es importante resaltar que al comienzo de la anemia por deficiencia de hierro, los niveles de hematocrito y hemoglobina disminuyen antes de presentarse manifestaciones morfológicas en los eritrocitos, por lo cual se encuentra una anemia normocítica; cuando la deficiencia de hierro es más avanzada se observa microcitosis e hipocromia. (Figura 5) (Villanueva, V. 2001).

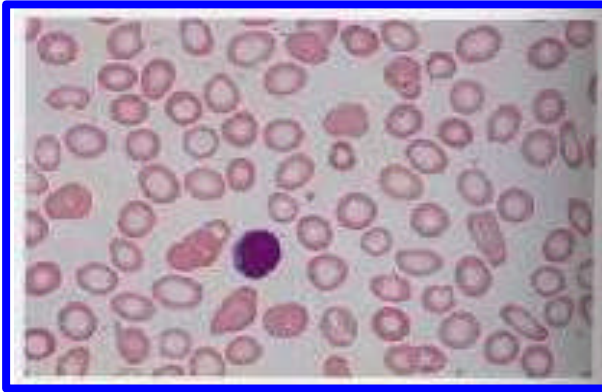
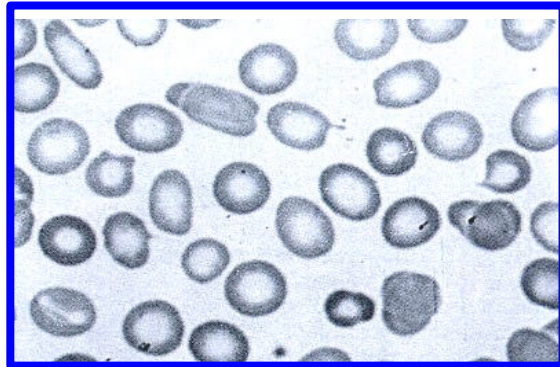


Figura 5. Anemia por deficiencia de hierro. Frotis de sangre periférica. Se observa microcitosis, hipocromía y poiquilocitosis (células de diferentes formas como ovalocitos, estomatocitos, eliptocitos).



## 2.4 Eritropoyetina:

La eritropoyetina (EPO) es una hormona glucoproteica, encargada de la estimulación de la médula ósea para desencadenar la proliferación, diferenciación y supervivencia de los progenitores eritroides. Es producida principalmente por las células intersticiales de la corteza renal, aunque en la etapa prenatal es producida también por el hígado, además se ha encontrado que puede ser sintetizada, en pequeñas cantidades por otros órganos como los pulmones, los testículos, el bazo y el cerebro; y su producción esta regulada por la hipoxia tisular. (Lacombe, C. y cols. 1998, Beguin, Y. 1999).

### 2.4.1 Estructura Molecular

La eritropoyetina tiene un peso molecular aproximado de 34000 daltons, esta compuesta por un 41% de hidratos de carbono, 11% de ácido sialico y 8% de N-acetilglucosamina. La eritropoyetina humana posee una conformación terciaria con estructura globular compuesta por cuatro alfa-hélices dispuestas en posición antiparalela con dos bucles de conexión largos y uno corto; además posee cuatro cisteínas unidas entre si por puentes disulfuro, (posición 7-161 / 29-33) lo cual le permite mantener su actividad biológica, ya que cuando estas uniones se oxidan se reduce la actividad de la hormona. (Figura 6) (Krantz, S. 1991).

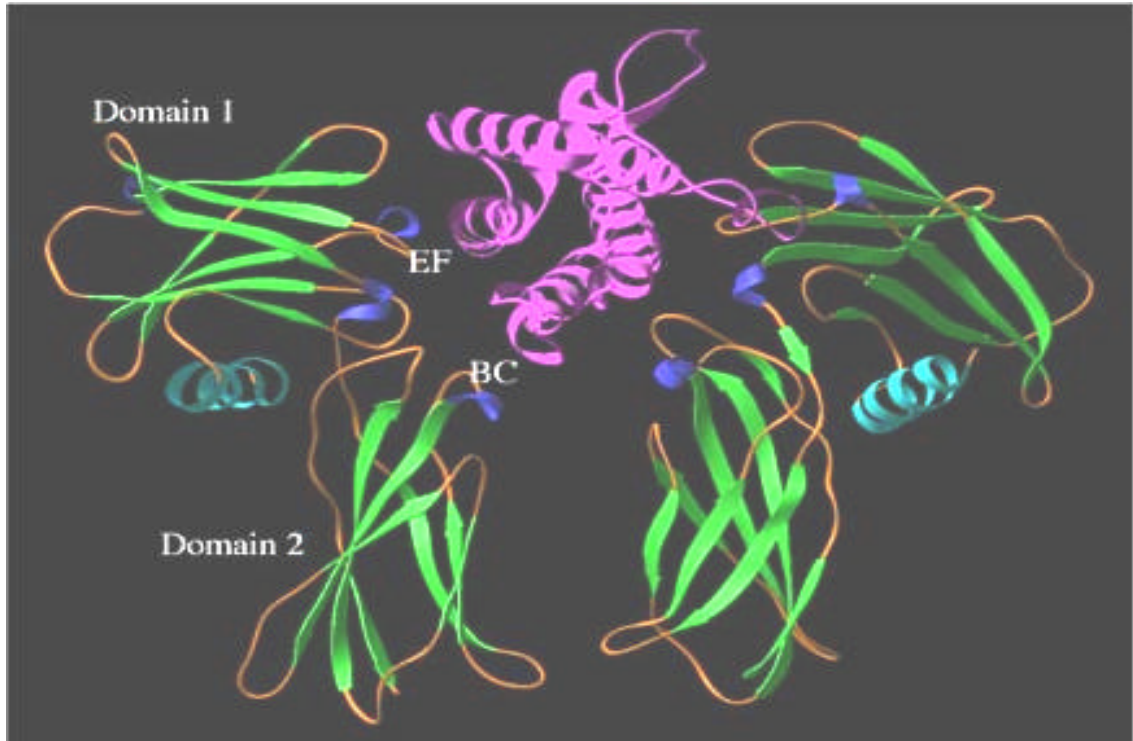


Figura 6. Estructura de la molécula de eritropoyetina (rosada) unido a su receptor (verde).

## 2.4.2 Síntesis

El gen de la eritropoyetina humana se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 7 (figura 7); existe como una sola copia en el ADN genómico de 5.4 kb, que contiene cuatro intrones y cinco exones para formar un péptido de 193 aminoácidos, de los cuales 27 aminoácidos conforman una secuencia líder la cual es eliminada cuando ocurre la secreción hormonal, dejando un péptido de 166 aminoácidos con un peso molecular de 18398 daltons. (Krantz. S, 1991).

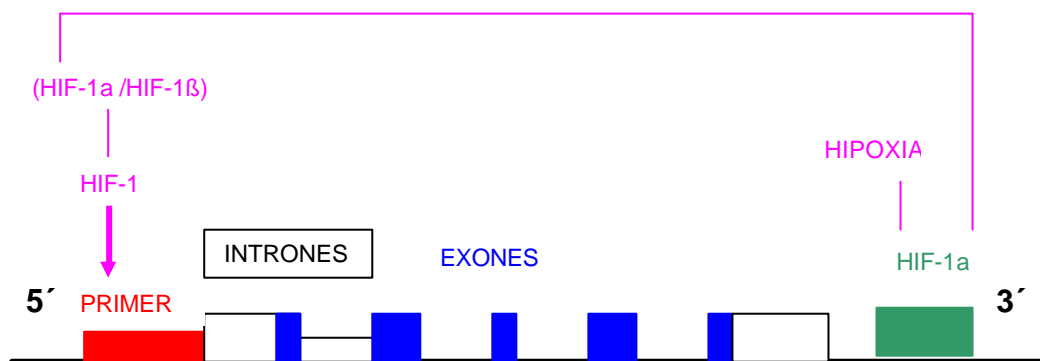


Figura 7. Estructura del gen de la eritropoyetina.

La producción de la eritropoyetina esta regulada por la hipoxia, la cual induce la transcripción del gen por medio del aumento en el cAMP de las células renales, disminución del calcio intracelular y estabilidad del factor inducible de hipoxia (HIF-1) que favorece la formación de la hormona. Se ha propuesto que el “sensor” que detecta la hipoxia y desencadena el proceso de transcripción del gen de eritropoyetina es una proteína tipo “hem”, que cambia su conformación dependiendo de

la unión al oxígeno. En condiciones de normoxia la proteína tipo “hem” permite la oxidación del HIF-1 para ser reconocida por la vía proteosomal y ser degradada. Mientras que en estado de hipoxia la HIF-1a es estable y puede formar heterodímeros con la HIF-1β para constituir la HIF-1, la cual es trasladada al núcleo para activar los factores de transcripción del gen de la eritropoyetina. (Figura 8). (Lacombe, C. 1998; Krantz, S. 1991; Ebert, B. 1999).

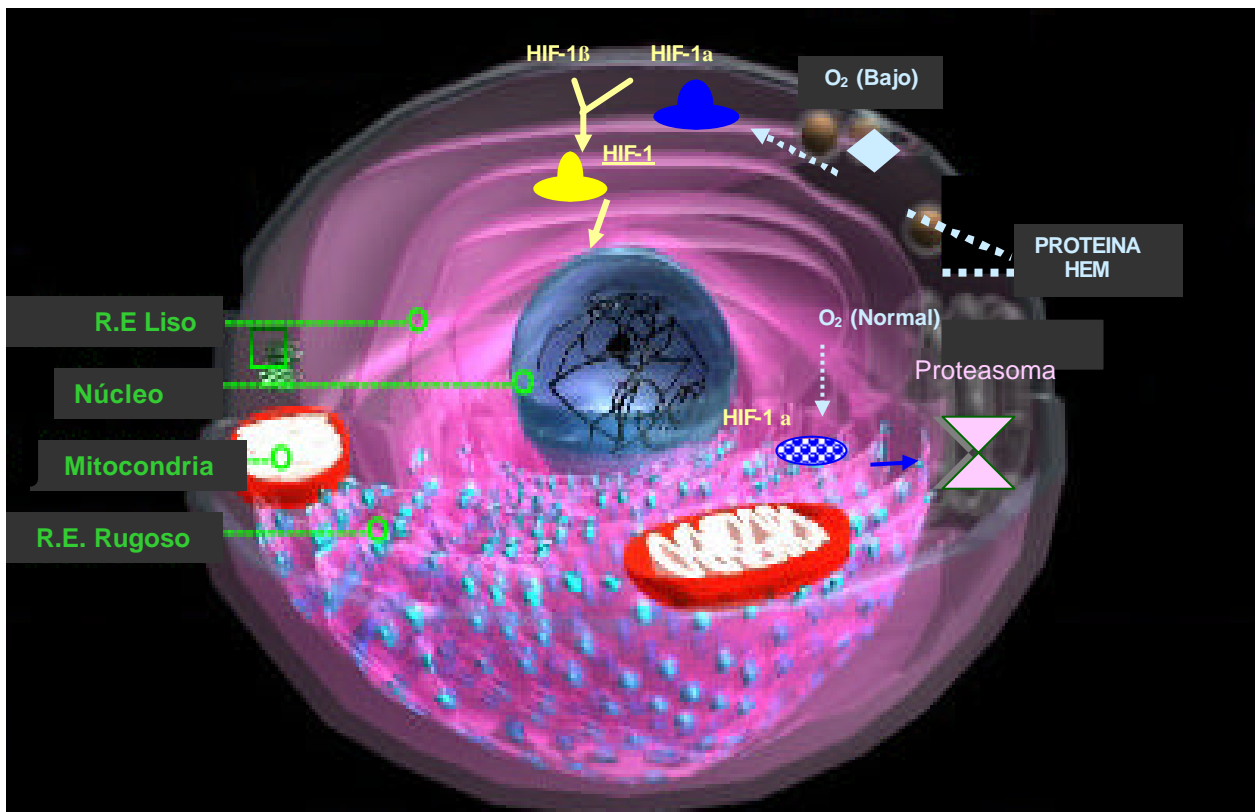


Figura 8. Proceso de transcripción del gen de la eritropoyetina en estado de hipoxia. En condiciones de normoxia, la proteína hem mantiene su conformación lo que permite que el HIF-1a sea degradado por el proteasoma. En estado de hipoxia el HIF-1a es estable, formando un complejo con HIF-1β, para formar HIF-1 que permite la transcripción del gen.

### **2.4.3 Receptores de Eritropoyetina y Distribución Celular**

Existen alrededor de  $1 \times 10^3$  receptores de eritropoyetina en células del linaje eritroide empiezan su expresión en el estadio de UFC-E y van aumentando a medida que evoluciona la célula, decreciendo progresivamente al producirse la maduración eritrocitaria. El receptor eritropoyetico esta constituido por una cadena de 66 kDa que le confiere la unión con la superficie celular y presenta adicionalmente dos moléculas, una de 85 kDa y otra de 100 kDa que le permite la unión de la hormona. (Lacombe, C y cols,1998)

Existen receptores de alta y baja afinidad para la eritropoyetina; la interacción de la eritropoyetina con los receptores de alta afinidad son los responsables del efecto biológico de la hormona frente a la hipóxia, mientras que los receptores de baja afinidad pueden estar implicados en el proceso de diferenciación celular. Las únicas células que presentan los dos tipos de receptores son aquellas que tienen maduración eritroide en respuesta a la eritropoyetina. (Lacombe, C y cols, 1998, Beguin, Y. 1999.).

#### **2.4.4 Relación de la Eritropoyetina con la Trombopoyesis**

Estudios preliminares realizados con modelos animales han mostrado que los megacariocitos y sus progenitores responden a la eritropoyetina, aumentando los recuentos plaquetarios y la proliferación celular. En humanos la eritropoyetina promueve la formación de colonias megacariocíticas, incrementando su tamaño, ploidía y número así como procesos de maduración citoplasmática; esto se demostró en estudios en los que fue administrada eritropoyetina recombinante humana a pacientes con enfermedad renal, en los cuales se observó que los recuentos plaquetarios aumentaron significativamente. (Beguin, Y. 1999, Krantz, S. 1991)

Estos hallazgos experimentales, pueden ser consecuencia de características comunes entre la eritropoyetina y la trombopoyetina ya que sus estructuras muestran secuencias homologas en el dominio N-terminal de la trombopoyetina, donde se muestra que de un 22% a un 25% es igual a la secuencia de aminoácidos de la eritropoyetina y tres de cuatro de las cisteinas que presentan estas dos hormonas están conservadas en las moléculas. Por otro lado el receptor de la trombopoyetina (c-Mpl) y el de la eritropoyetina, pertenecen a la familia de receptores hematopoyéticos que tienen una homología del 26%, además la trombopoyetina y la eritropoyetina actúan tanto en megacariopoyesis

(estimulación del crecimiento de CFU-Meg), como en la eritropoyesis (generación de UFC-E y UFB-E) en estudios realizados in vitro. También se ha demostrado que la eritropoyetina estimula directamente la megacariopoyesis porque los megacariocitos expresan sitios de alta afinidad de unión para la eritropoyetina, lo cual sugiere que la eritropoyetina no solo afecta la producción eritrocitaria, sino que paralelamente actúa en la formación plaquetaria. (Beguin, Y. 1999; Broudy, V.1997)

## **2.5 Trombopoyesis**

### **2.5.1 Etapas de Desarrollo**

Las células sanguíneas se generan a partir de una célula pluripotencial (Stem Cell) de la cual se desarrolla una unidad formadora de brotes megacariocíticos (BFU-MK) siendo la célula progenitora trombopoyética más primitiva de las plaquetas, la cual produce posteriormente numerosas unidades formadoras de colonias megacariocíticas (CUF-MK), las cuales evolucionan a células progenitoras diferenciadas denominadas megacariocitos, estas células sufren un proceso llamado endomitosis, donde la replicación del DNA se lleva a cabo en ausencia de citoquinesis y carioquinesis. Sobre la endomitosis se han planteado varias hipótesis como son: una fase continua S que no se detiene hasta la ploidía 2N, una

sucesión de fases S, G1 y G2 sin entrar a la mitosis y una mitosis abortiva sin división celular. En un estudio realizado por Vitrat y cols se comprobó que este proceso es debido a una mitosis abortiva, posiblemente por las alteraciones en la regulación de la salida de la fase mitótica. La última etapa en la formación plaquetaria es la fragmentación física de los citoplasmas megacariocíticos. La producción plaquetaria esta regulada por el número de megacariocitos producidos en médula ósea, el tamaño de los mismos y la trombopoyetina (Figura 9). (Vitrat. N y cols, 1998, Gordon. M y cols, 1992)

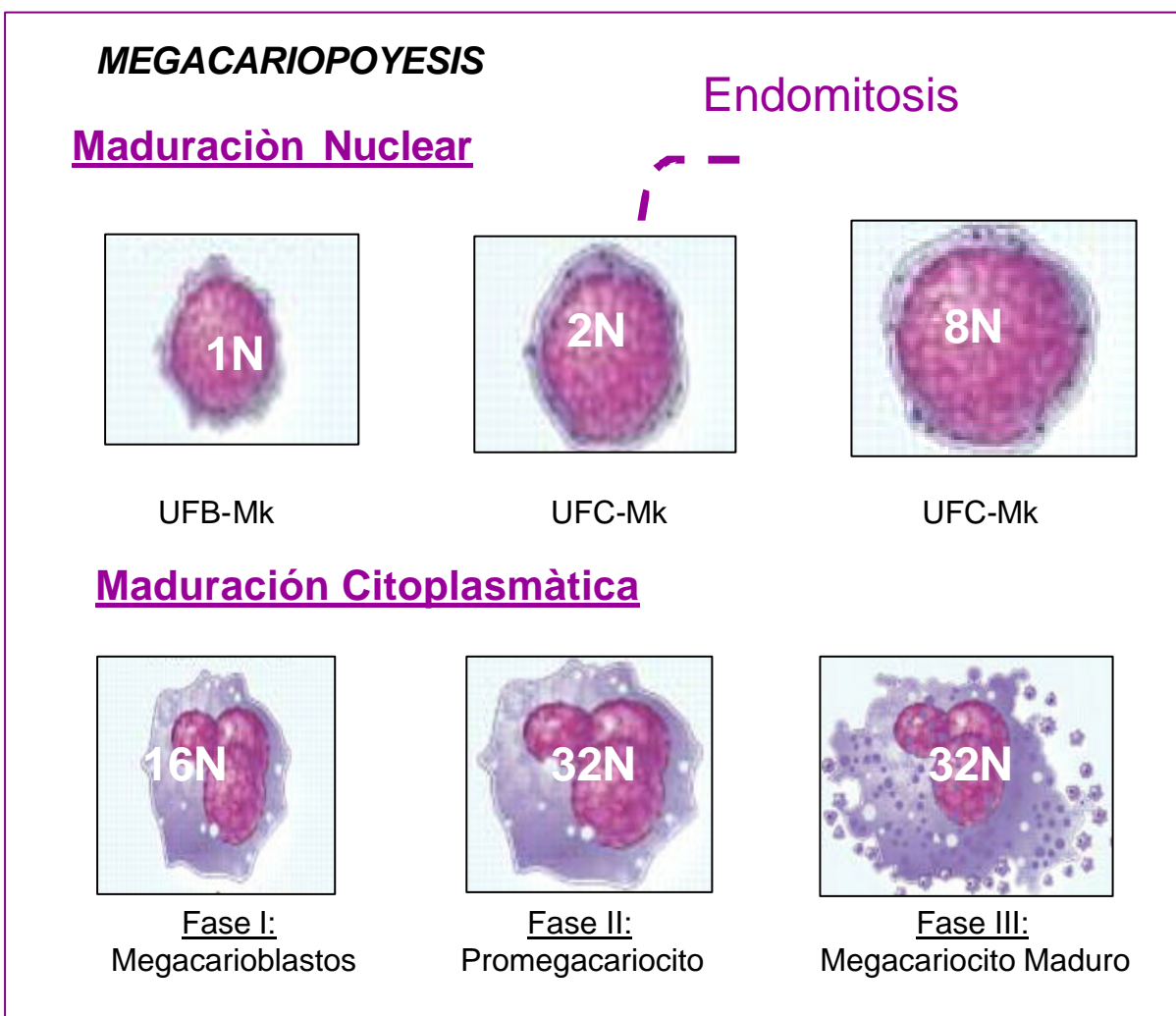


Figura 9. Proceso de Trombopoyesis

## **2.5.2 Factores Solubles Estimuladores de Crecimiento Plaquetario**

La endomitosis megacariocítica es el único proceso biológico en el que se involucra la duplicación del núcleo sin división celular, dando como resultado la formación de células de gran tamaño (megacarioblastos). Los megacariocitos están localizados cerca de la membrana sinusoidal dentro de la médula ósea; e inician la producción plaquetaria con el desarrollo de extensiones citoplasmática las cuales se fragmentan para generar las plaquetas. En el proceso de formación plaquetaria actúan factores de crecimiento hematopoyético que promueven la producción plaquetaria, como ciertas citocinas que sirven como factores de proliferación y amplificación de la obtención plaquetaria y un segundo grupo que actúan como factores de maduración interviniendo en las células más diferenciadas. Entre estos factores de crecimiento encontramos citocinas como la interleucina 3 (IL-3), interleucina 6 (IL-6), interleucina 11 (IL-11) (tabla 2), la trombopoyetina y la eritropoyetina que junto con algunas de las citocinas anteriormente nombradas promueve la maduración megacariocítica determinada por el tamaño, el número y la ploidía en los megacariocitos. La trombopoyetina es el mayor regulador de la megacariopoyesis, ayudando a la proliferación y diferenciación de los progenitores megacariocíticos; esta hormona es el primer ligando identificado que se une al receptor c-Mpl sobre la superficie megacariocítica y plaquetaria. (George, J. 2000; Broudy, V. 1997, Takatoku, M. 1997, Gordon, M. 1992.)

INTERLEUCINA	SITIO DE PRODUCCIÓN	EFFECTOS SOBRE	PRINCIPAL FUNCIÓN
IL-11	Estroma medular	Megacariocitos	Producción de plaquetas
IL-6	Linfocitos T ayudadores	Linfocitos B	Estimula la UFC-Meg
IL-3	Linfocitos T	Célula basal de la médula	Estimulador múltiple de la formación de colonias.

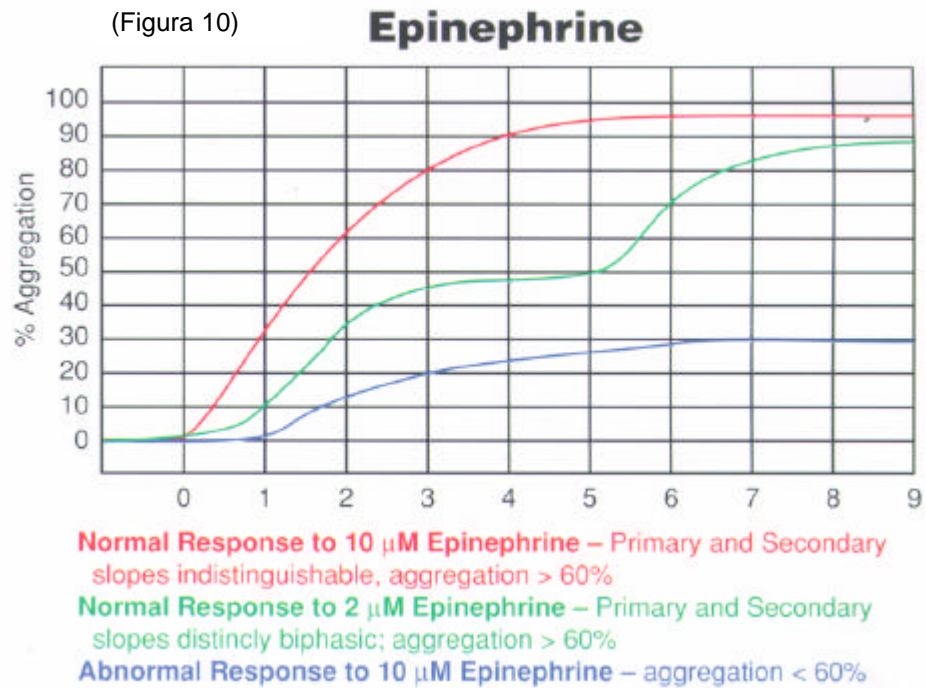
Tabla 2. Citocinas involucradas en la trombopoyesis.

Entre las proteínas de membrana (CD) en la superficie de megacariocitos y plaquetas las más comunes son la CD-41 y la CD-61 que conforman la glicoproteína IIb /IIIa implicadas en el proceso de agregación plaquetaria.

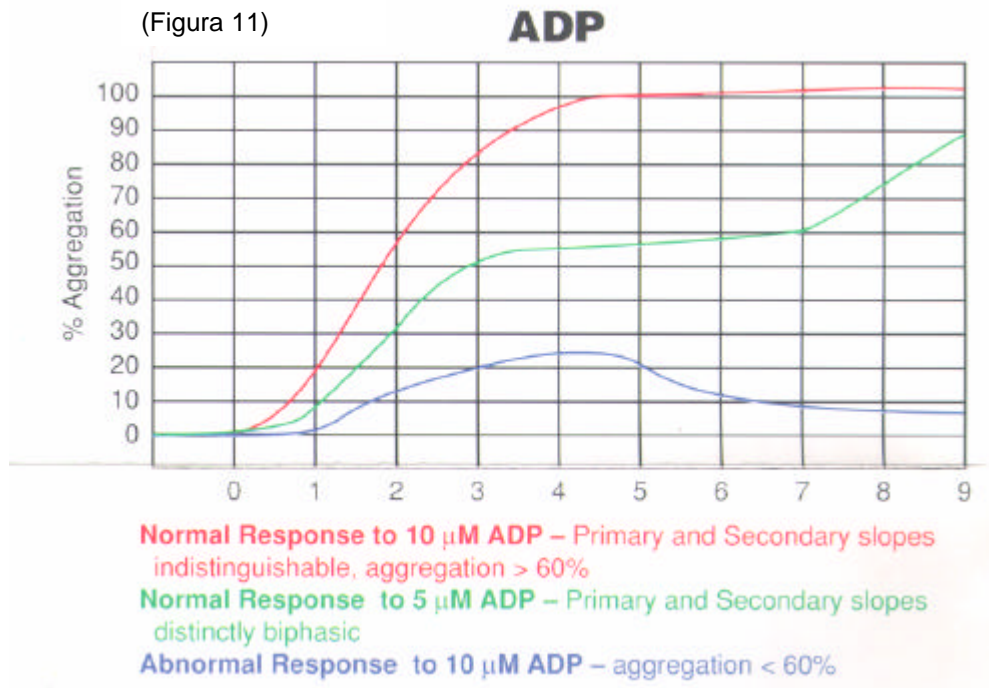
### 2.5.3 Evaluación de la Actividad Plaquetaria en el Laboratorio

La funcionabilidad plaquetaria es evaluada por medio de una prueba de laboratorio llamada *Agregometría Plaquetaria*, la cual mide la velocidad y el grado en que las plaquetas dispersas en una muestra de plasma rico en plaquetas forman agregados plaquetarios después de la adición de sustancias que estimulan la agregación (agonistas) como epinefrina, ADP, colágeno y ristocetina. Sobre los agonistas utilizados sobre esta prueba se conoce:

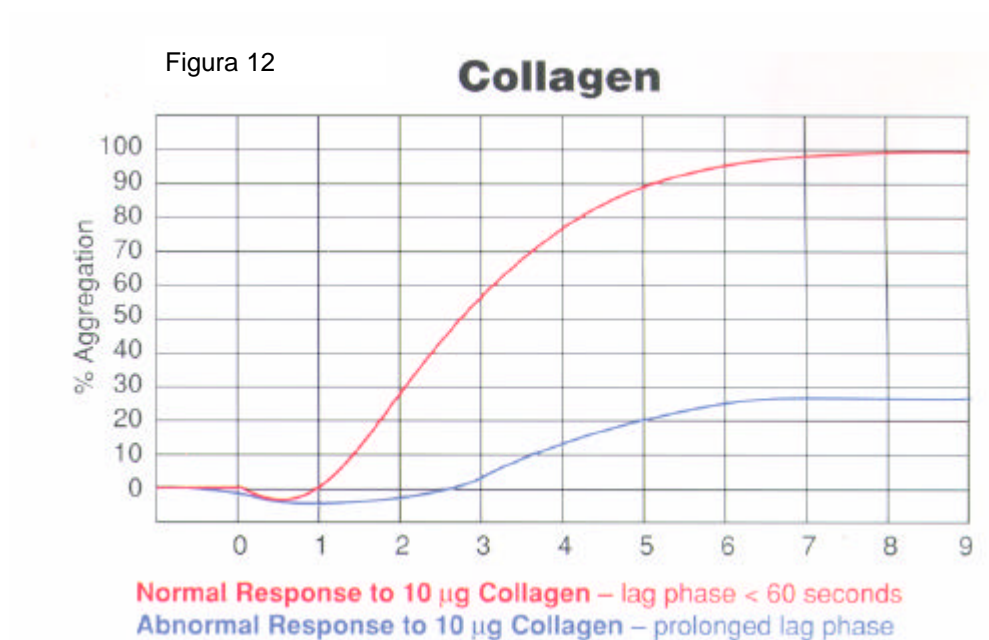
- ? Epinefrina: Activa un proceso de contractibilidad citosólica que permite la liberación de calcio de retículo endoplasmico, lo que conduce a un aumento en la expresión de la glicoproteína IIb/IIIa para unir fibrinogeno. (Figura 10)



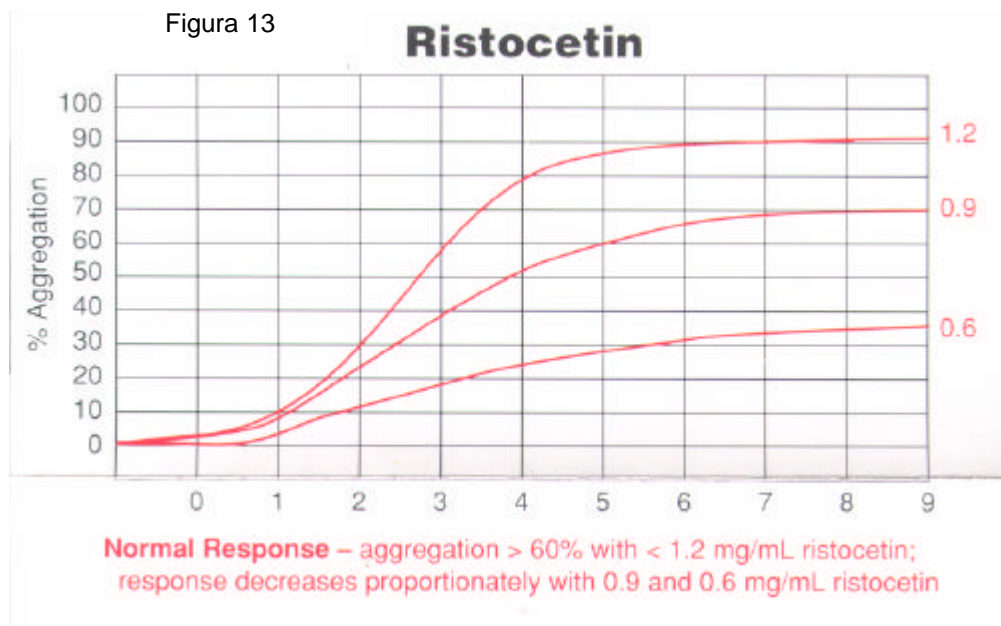
- ? ADP: Promueve la aglutinación plaquetaria al unirse a receptores específicos. La exposición de las plaquetas a este agonista permite la liberación del contenido de los gránulos e induce la síntesis de tromboxano A-2, permite el cambio morfológico de una estructura uniforme a una esfera espiculada y activa el receptor de fibrinogeno produciendo la agregación plaquetaria (Figura 11).



- ? Colágeno: Induce la liberación de ácido araquidónico de las plaquetas, el cual es convertido en endopéroxidos, que inician la liberación de ADP. Algunos endoperoxidos se transforman en tromboxano A-2, el cual es un potente activador de la agregación plaquetaria. (Figura 12)



? Ristocetina: Permite la aglutinación de las plaquetas al promover la expresión de la glicoproteína Ib en presencia del factor Von Willebrand (Figura 13). (Rao, G y cols.1997; Jin, J y cols. 1998)



La prueba de Agregometría plaquetaria se basa en los cambios de transmisión óptica de un plasma rico en plaquetas en presencia de agonistas, ya que la densidad óptica del plasma decrece a medida que se va presentando la agregación plaquetaria.

## **2.6 Relación entre Anemia Ferropénica, Trombocitosis y Riesgo Protrombótico**

En estudios anteriores se ha demostrado que la anemia ferropénica puede presentarse acompañada de recuentos plaquetarios elevados sin tener una explicación clara al respecto, en 1974 Karpatkin y cols realizaron un estudio que pretendía demostrar el papel del hierro como regulador en la trombopoyesis; utilizando animales de experimentación, distribuidos en cuatro grupos (1. sangrados crónicamente 2. sangrados con reemplazamiento de hierro 3. con dieta deficiente de hierro 4. no sangrados) encontrando que en el grupo 1 y 3 se presentó un aumento de 1.4 veces en el recuento plaquetario con respecto al valor normal, concluyendo que tanto la deficiencia de hierro como el sangrado crónico pueden alterar el recuento plaquetario; igualmente en el grupo 2 se encontró un aumento en el recuento plaquetario de 2.5 veces lo cual permitió relacionar el reemplazamiento de hierro con un aumento en el recuento de plaquetas. (Karpatkin, S y cols. 1974).

En la anemia por deficiencia de hierro se presenta una trombocitosis reactiva en ausencia de enfermedades mieloproliferativas, diferenciándose así de la trombocitosis clonal que se presenta secundaria a enfermedades neoplásicas. En la anemia por deficiencia de hierro los recuentos plaquetarios se incrementan hasta  $1'000.000/ \text{mm}^3$ ,

posiblemente por efecto compensatorio de la eritropoyetina. (Friedberg, N y cols. 1998; Akan, H y cols. 2000).

Investigaciones realizadas recientemente muestran que la eritropoyetina interviene en la producción plaquetaria además de la producción y maduración de eritrocitos, lo cual es demostrado en los estudios realizados por Beguin y cols en 1999 donde utilizaron ratas que recibían diariamente diferentes dosis de eritropoyetina humana recombinante según el grupo; encontrando que las dosis altas de eritropoyetina inducen cambios en los recuentos plaquetarios. Esto permitió concluir que los megacariocitos poseen sitios de alta afinidad para la eritropoyetina, siendo importante anotar que la eritropoyetina promueve el incremento plaquetario por un aumento en la actividad hematopoyetica. (Beguin, Y y cols, 1999)

El efecto de la eritropoyetina sobre la trombopoyesis se atribuye a tres aspectos:

- 1) Homología entre el dominio amino terminal de la trombopoyetina y la eritropoyetina.
- 2) Precursor común de los linajes eritroides y megacariocíticos
- 3) Receptores de alta afinidad para la eritropoyetina en los megacariocitos

La trombopoyetina ha sido reconocida como una citocina importante en la regulación y diferenciación de las células progenitoras megacariocíticas,

desencadenando mecanismos de fosforilación de las proteínas reguladoras de la diferenciación megacariocítica, especialmente de las células que expresan receptor c-mpl. (Roojnuckarin, P y cols. 1999; Friedberg, N y cols. 1998; Jilma, P y cols. 2000; Park, H y cols. 1997; Beguin, Y y cols. 1999).

Se cree que el mecanismo por el cual la eritropoyetina afecta los recuentos plaquetarios durante la anemia ferropénica es por el aumento compensatorio de dicha hormona como consecuencia de la anemia, lo cual provoca una eritropoyesis más activa que no solo conlleva al aumento de los índices eritrocitarios sino además a un aumento en el número de plaquetas provocando así la generación de una trombocitosis reactiva. (Figura 14)

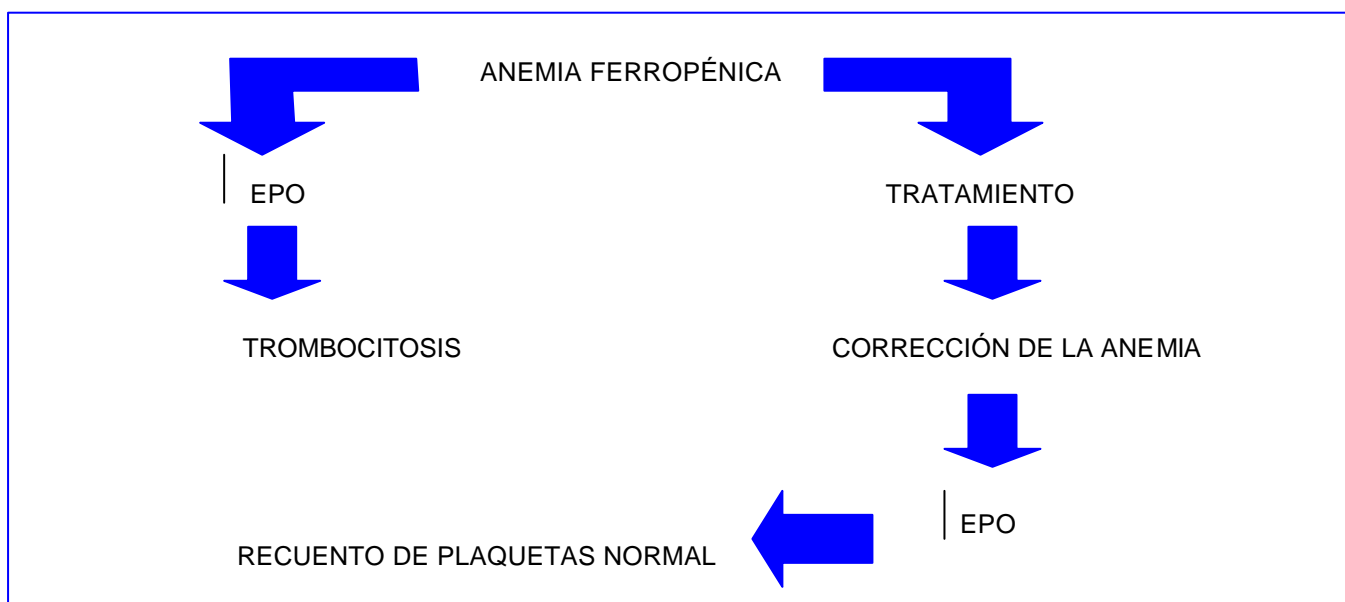


Figura 14. Mecanismo por el cual la eritropoyetina produce trombocitosis reactiva en la anemia ferropénica.

En reportes internacionales realizados sobre casos clínicos se ha observado que la trombocitosis secundaria a anemia ferropénica puede generar complicaciones como el taponamiento de pequeños vasos sanguíneos e incluso la formación de trombos en la arteria carótida, cuya generación parece no corresponder al aumento en los recuentos plaquetarios sino más bien a una posible activación y funcionamiento anormal de las plaquetas. Estos trombos al parecer tienen una resolución sin complicaciones, al implementarse tratamiento correctivo de la anemia ferropénica y anticoagulación; aunque constituye un riesgo latente para estos individuos. (Akins, P y cols. 1996).

### 3. JUSTIFICACIÓN

Investigaciones realizadas hace algunos años muestran diferentes factores que pueden generar anemia ferropénica y determinar la incidencia de la enfermedad, utilizando como variables, la edad, el sexo, y la región de donde provienen los pacientes. Sin embargo no se han relacionado las posibles consecuencias del aumento en los recuentos plaquetarios en la anemia ferropénica y su etiología.

En Colombia estudios realizados en 1997 muestran que aproximadamente una tercera parte de la población presenta anemia ferropénica con un registro aproximado de 790 casos en ocho departamentos a nivel nacional (anexos 1 y 2). A pesar que en Colombia las condiciones nutricionales no son las mejores y esta enfermedad es frecuente, no existen datos actualizados sobre esta patología ni investigaciones al respecto. (Mora y Rodríguez, 1986, Ministerio de Salud, 1997)

Varios pacientes asisten a consulta externa refiriendo debilidad general, adinamia, letargo y otros síntomas asociados con anemia; luego se les realiza las pruebas de laboratorio correspondientes y sus hemogramas generalmente revelan trombocitosis (con etiología aún no muy clara) que pueden alcanzar recuentos de  $1'000.000/\text{mm}^3$ , parámetros que tienden a normalizarse cuando el paciente se somete a tratamiento; además existen

reportes en la literatura internacional que presentan casos de individuos con anemia ferropénica y trombocitosis y desarrollan trombos en la arteria carótida interna sin causa conocida. Al respecto no existen estudios por lo menos exploratorios, que revelen las posibles causas por las cuales un individuo sin antecedentes de aterosclerosis y solo con anemia y recuentos elevados de plaquetas desarrollen tal complicación.

Nuestro estudio pretende explorar la posible etiología de la trombocitosis reactiva asociada a anemia ferropénica con los niveles de eritropoyetina y aportar un nuevo conocimiento acerca de la relación que pueda existir entre anemia ferropénica que cursan con trombocitosis y posibles alteraciones en la actividad plaquetaria que contribuyan al desarrollo de trombos no asociados con aterosclerosis, por medio de la realización de pruebas de ELISA para eritropoyetina y agregometría para evaluar la función plaquetaria.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo General:**

Evaluar los niveles de eritropoyetina y actividad plaquetaria en pacientes que cursan con anemia ferropénica y trombocitosis.

### **4.2 Objetivos Específicos:**

- ? Determinar los parámetros básicos de diagnóstico de anemia ferropénica: índices hemáticos primarios y secundarios, sideremia y TIBC.
- ? Cuantificar los niveles de eritropoyetina en individuos que presentan trombocitosis asociada a anemia ferropénica.
- ? Relacionar las concentraciones de eritropoyetina con el desarrollo de la trombocitosis en los individuos del estudio.
- ? Determinar la funcionabilidad plaquetaria por medio de la prueba de agregometría en individuos que presentan trombocitosis asociada a anemia ferropénica.
- ? Determinar los niveles de colesterol de baja densidad (LDL) como factor de riesgo en el desarrollo de procesos protrombóticos en los individuos del estudio.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1 Tipo de Estudio**

Observacional, Descriptivo, Prospectivo. Estudio preliminar.

### **5.2 Hipótesis**

Los pacientes con anemia por deficiencia de hierro presentan trombocitosis reactiva debido a la acción de la eritropoyetina sobre el linaje megacariocítico; este aumento en los recuentos plaquetarios predispone a los pacientes con Anemia Ferropénica al desarrollo de procesos protrombóticos.

### **5.3 Población de Referencia**

Todos los pacientes con anemia ferropénica y trombocitosis.

### **5.4 Población de Estudio**

Los pacientes incluidos en este estudio asisten al Hospital Militar Central, al área de hematología especial, Pontificia Universidad Javeriana e Instituto de Seguros Sociales PAIBA, donde fueron seleccionados según los siguientes criterios:

Criterios de inclusión:

- ? Individuos mayores de 18 años y menores de 55 años, sin distinción de sexo, estrato socio-económico o académico.
- ? Individuos que presenten anemia ferropénica presuntiva o diagnosticada en el área de hematología especial en algunas de las instituciones mencionadas.
- ? Individuos que participen voluntariamente en el estudio, accediendo a diligenciar un formato de consentimiento informado (anexo 3).

Criterios de exclusión:

- ? Mujeres en lactancia o posparto.
- ? Individuos con enfermedades mieloproliferativas.
- ? Individuos transfundidos en los últimos tres meses.
- ? Cirugías mayores.
- ? Individuos con antecedentes de ateromas o arterioesclerosis.

Se recolectaron un total de 32 muestras de pacientes con anemia ferropénica y recuentos elevados de plaquetas y dos muestras control. Los pacientes diligenciaron un formato de consentimiento, previa autorización, y fueron registrados sus datos personales: nombre, edad, número de identificación, número telefónico, antecedentes clínicos y tratamientos recibidos; con fines logísticos en la encuesta (*ver anexo 4*).

## 5.5 Métodos

Las muestras de sangre fueron tomadas por punción venosa y distribuidas en tres tubos de la siguiente manera:

<b>NÚMERO DE TUBO</b>	<b>CONTENIDO</b>	<b>FINALIDAD</b>
TUBO 1	5 ml de sangre con anticoagulante EDTA	Sangre total para cuadro hemático
TUBO 2	5 ml de sangre con anticoagulante Citrato de Sodio	Recolección de plasma rico en plaquetas para agregometría
TUBO 3	10 ml de sangre sin anticoagulante	Obtención de suero para cuantificación de eritropoyetina, sideremia y TIBC

Tabla 3. Distribución de la recolección de muestras

Las muestras de sangre con EDTA y citrato de sodio fueron procesadas el mismo día de la recolección y los sueros obtenidos se alicuotaron y almacenaron a una temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su procesamiento (Tabla 4.).



### **5.5.1 Cuadro Hemático Automatizado:**

La muestra recolectada en tubo con EDTA, fue utilizada para la realización del cuadro hemático en un Coulter Microdiff 18 Series de Coulter Corporation (equipo de tercera generación), el cual utiliza la impedancia eléctrica para realizar la lectura. En este estudio se tuvieron en cuenta las siguientes variables: hematocrito, hemoglobina, recuento de glóbulos rojos, VCM, HCM, CHCM, recuento plaquetario y recuento de glóbulos blancos.

### **5.5.2 Frotis de Sangre Periférica (FSP):**

A partir de la muestra recolectada en EDTA se realizó un extendido de sangre teñido con Wright (previa estandarización del colorante). Observando en objetivo de alta resolución el cuerpo del extendido y analizándose la anisocitosis, poiquilocitosis, hipocromia, recuento indirecto de plaquetas y diferencial de leucocitos; información que reportada en un formato de FSP (anexo 5).

### **5.5.3 Sideremia:**

Los sueros almacenados fueron descongelados para la realización de esta prueba, utilizándose un kit de Sera-Pak para hierro de Bayer Corporation. Esta técnica se basa en el principio de la liberación del hierro

de su proteína transportadora (transferrina) a un pH de 4.8, permitiendo la reducción del hierro de un estado ferrico a ferroso en presencia de ácido ascórbico. Los iones ferrosos quelan con el ferene S provocando la formación de un compuesto coloreado que puede ser determinado colorimetricamente a 570 nm en un RA-50 Technicon Emes (espectrofotómetro), del cual obtuvimos una absorbancia que es directamente proporcional a la concentración de la sustancia analizada (Tabla 5)

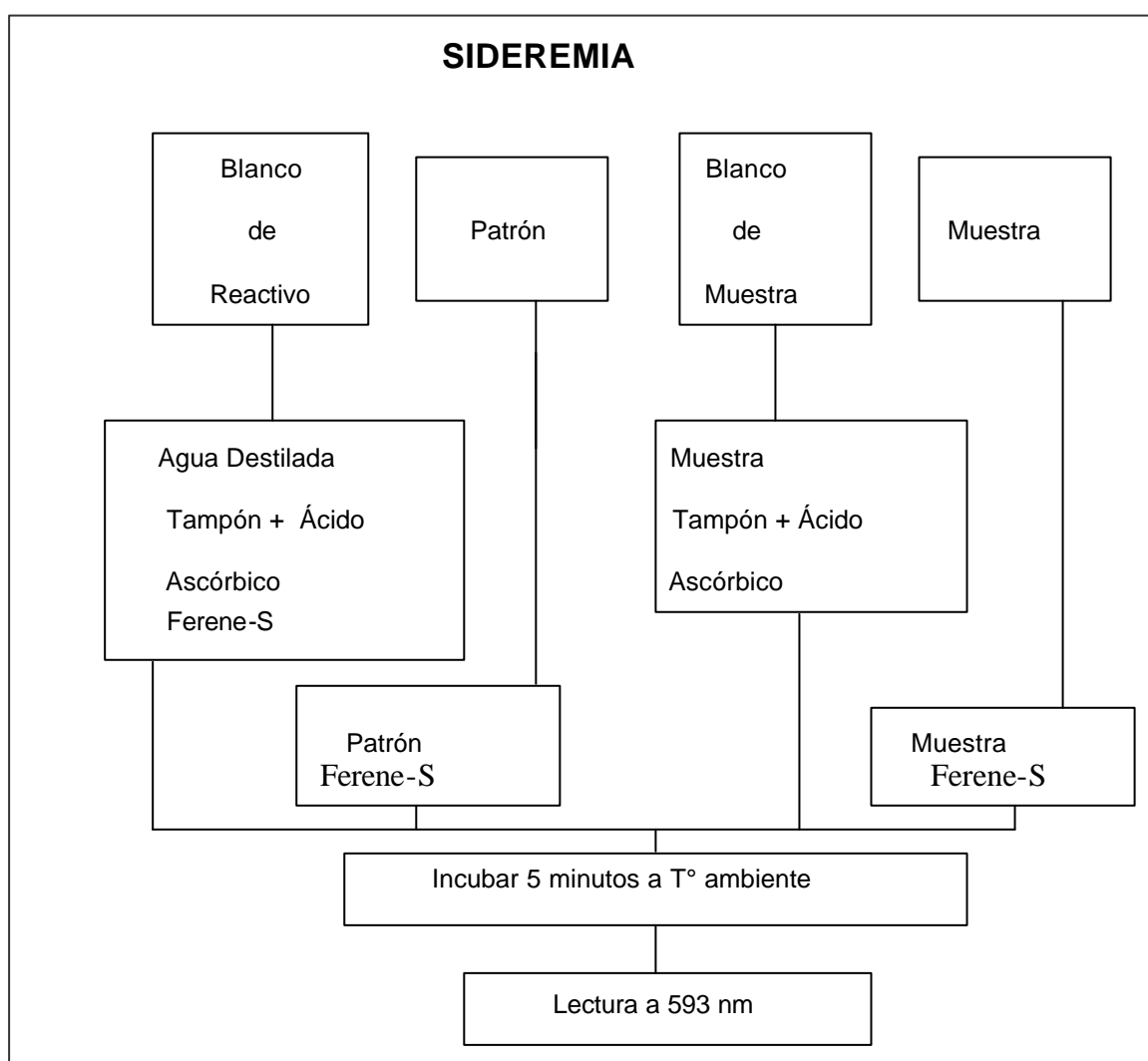


Tabla 5. Protocolo de la técnica de sideremia

#### 5.5.4 Capacidad de Fijación del Hierro a la Transferrina (TIBC):

Esta prueba fue realizada con un kit de Sera-Pak Capacidad de Fijación de Hierro de Bayer Corporation, el cual tiene como fundamento que la proteína transportadora de hierro (transferrina) es saturada completamente por la adición de iones ferricos a la muestra. El exceso de hierro es eliminado por la adición de carbonato de magnesio. La posterior centrifugación y extracción del sobrenadante, permite la determinación del TIBC por medio de la técnica utilizada en sideremia (técnica colorimétrica), realizando la lectura a 570 nm en un RA-50 Technicon Emes (espectrofotómetro) (Tabla 6 y 7)

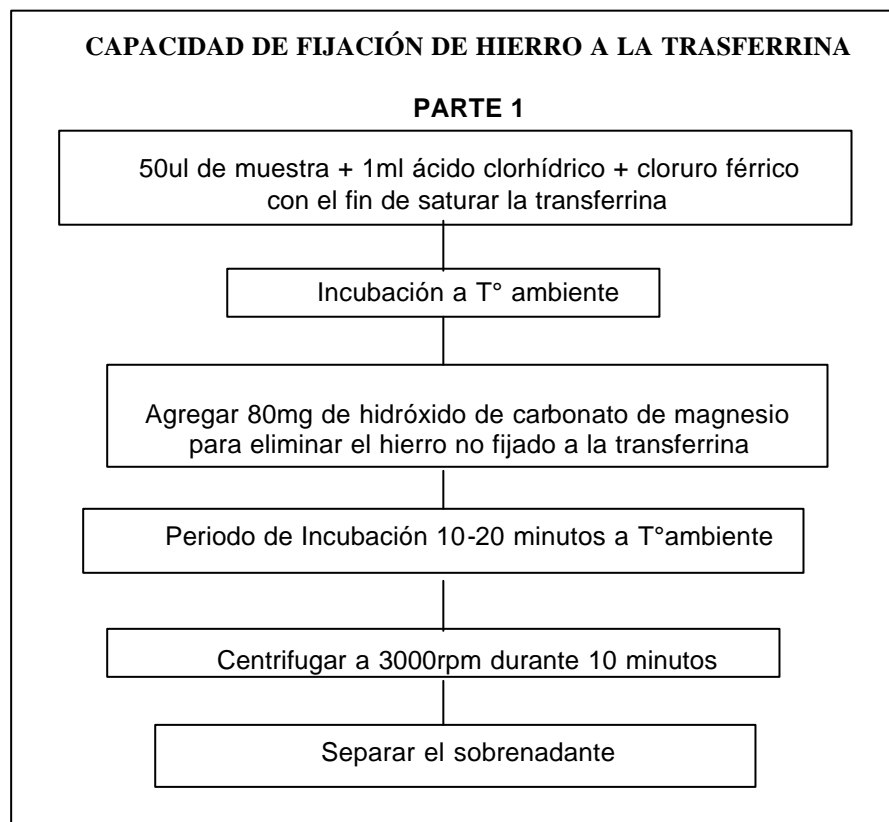


Tabla 6. Protocolo de la técnica de capacidad de fijación de hierro parte 1.

## CAPACIDAD DE FIJACIÓN DE HIERRO A LA TRANSFERRINA PARTE 2



Tabla 7. Protocolo de la técnica de capacidad de fijación de hierro parte 2.

### 5.5.5 Agregometría Plaquetaria:

Las muestras recolectadas en citrato de sodio fueron utilizadas para la prueba de agregometría plaquetaria la cual se basa en la disminución de la densidad óptica de un plasma rico en plaquetas expuesto a diferentes agonistas (epinefrina, ADP, colágeno y Ristocetina) (Tabla 8); reactivos provenientes de Helena Laboratories. Dicha prueba fue realizada en un equipo analizador multifuncional de la agregación plaquetaria, Platelets Aggregation Chromogenic Kinetics System-4 (PACKS-4) de Helena Laboratories (Figura 15).

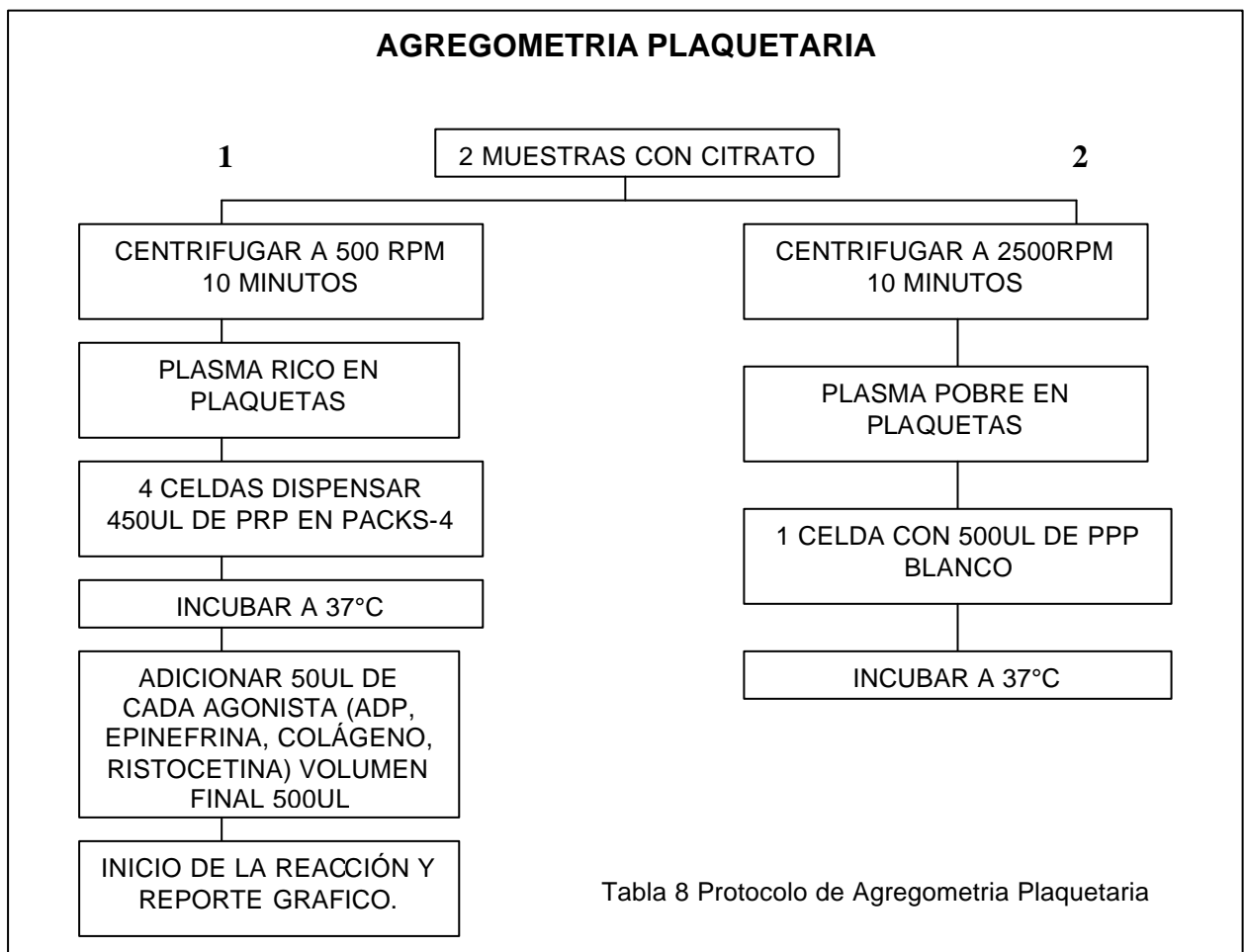




Figura 15. Platelets Aggregation Chromogenic Kinetics System-4 (PACKS-4)

### 5.5.6 ELISA para la Cuantificación de Eritropoyetina

Las muestras de suero de los individuos de estudio, fueron utilizadas para la realización de un ELISA tipo sándwich en donde se determinaron los niveles de eritropoyetina (cadena de 165 aminoácidos biológicamente activa), mediante la utilización estreptavidina (fase sólida) que es una proteína de 60 kDa procedente de *Streptomyces avidinii*, tetramérica, con alta afinidad por la biotina. La biotina es una proteína soluble en agua (vitamina H) de peso molecular bajo (244 Da). Presenta un grupo carboxílico que permite su unión a los restos amino de las proteínas. La biotinización es una reacción bioquímica que permite unir biotina a una gran variedad de moléculas como enzimas, lectinas, anticuerpo, ácidos

nucleicos, etc. La característica principal es que el anticuerpo biotinilado puede visualizarse mediante el complejo estreptavidina-biotina-peroxidasa, (sistema ABC). El método ABC es el más utilizado ya que tiene la máxima sensibilidad. La peroxidasa actúa sobre el sustrato tetrametilbencidina (TMB) oxidándolo, provocando la formación de color el cual es directamente proporcional a la concentración de eritropoyetina de cada muestra (Tabla 9); esta prueba fue registrada en un sistema fotómetro designado para leer y calcular los resultados de ensayos colorimétricos de punto fina en un lector de microELISA Stat Fax 303 Plus (Figura 16).



(Figura 16) Lector de microELISA Stat Fax 303 Plus.

## ERITROPOYETINA

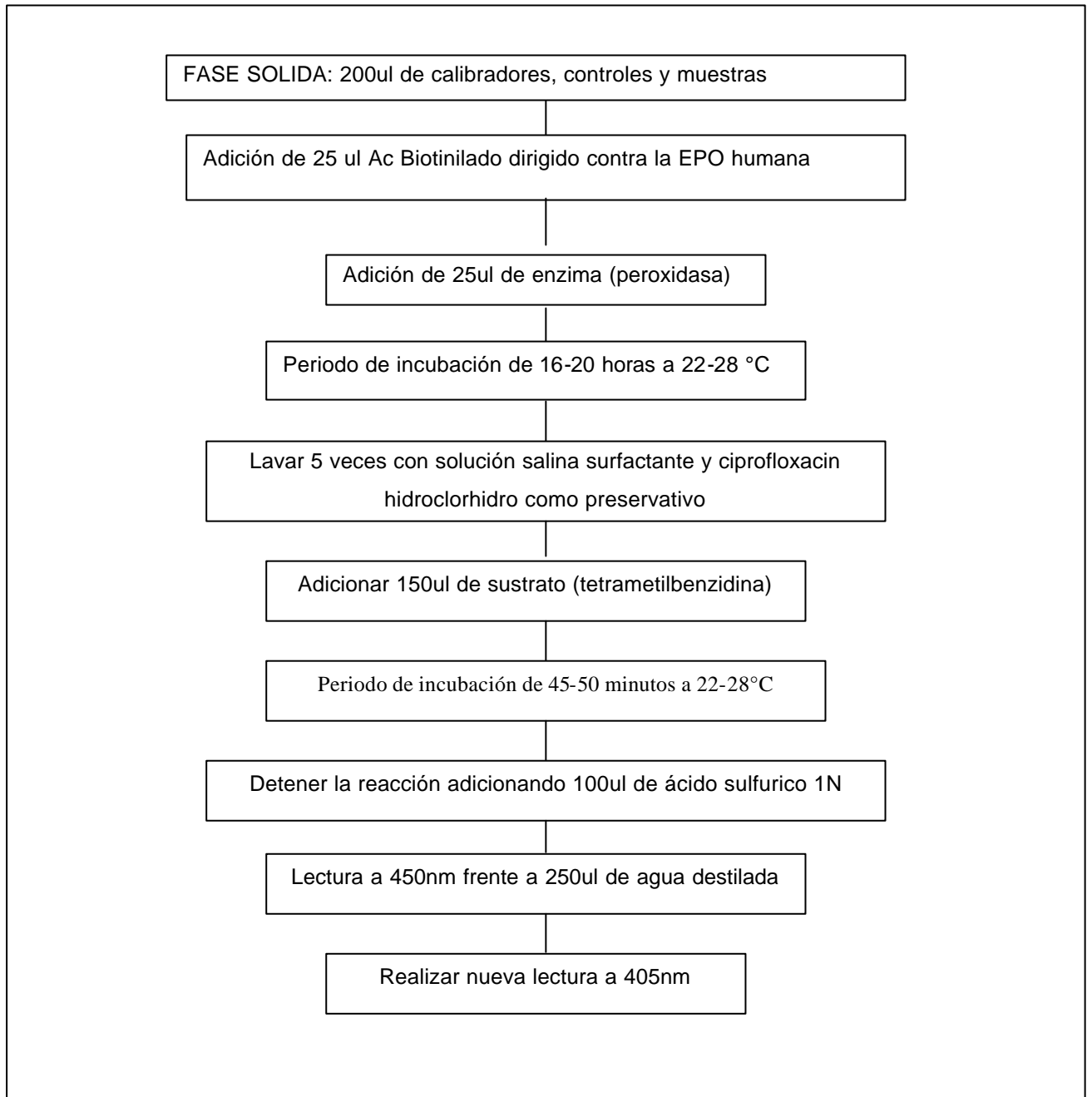
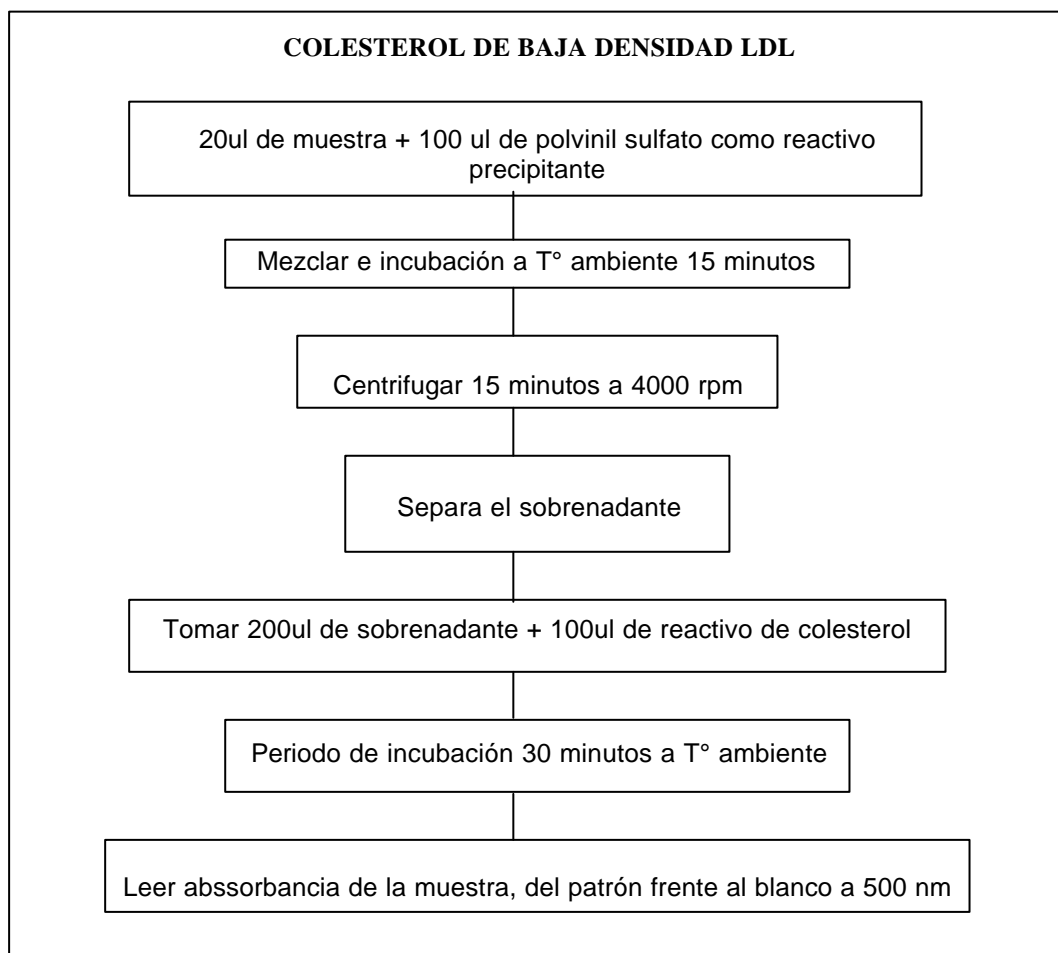


Tabla 9 Protocolo para eritropoyetina

### 5.5.7 Determinación de Colesterol de Baja Densidad (LDL)

Esta prueba fue realizada con un Kit marca BioSystems el cual tiene como fundamento que las lipoproteínas de baja densidad (LDL) se precipitan en presencia de polvinil sulfato. El colesterol (LDL) se calcula por diferencia entre los valores de colesterol en el suero y en el sobrenadante tras la precipitación, (técnica colorimétrica) (Tabla 10), realizando la lectura a 500 nm en un RA-50 Technicon Emes (espectrofotómetro)

Tabla 10 Protocolo para LDL



## 6. RESULTADOS

### 6.1 Análisis Estadístico

El estudio es observacional, descriptivo, prospectivo; de carácter preliminar, al cual se le aplicó una estadística correlacional con base en el cálculo del coeficiente de correlación, el cual mide la relación existente entre dos variables numéricas en forma porcentual. Su cálculo es dado por la expresión:

$$r = \frac{\text{COV}(X,Y)}{s_x * s_y}$$

Donde:

COV(X,Y): Es la covarianza calculada entre X y Y, está se define como la relación existente entre las dos variables estudiadas, se interpreta como:

- Si la covarianza es positiva, la relación entre las variables estudiadas es una relación directa. Si una variable aumenta la otra también.
- Si la covarianza es negativa, la relación entre las variables estudiadas es una relación inversa. Si una variable aumenta la otra disminuye.
- Si la covarianza es cero, la relación entre las variables estudiadas no se puede establecer.

$$\text{Se calcula por } \text{COV} = \frac{\sum_{i=1}^n [(X_i - \bar{X}) * (Y_i - \bar{Y})]}{n}$$

Cuando se aplica el coeficiente de correlación para los datos de SIDEREMIA Y TIBC obtenidos de la población de estudio se obtiene una covarianza negativa, lo que muestra una relación inversa entre las variables estudiadas; mientras que para los datos de PLAQUETAS Y TIBC se observa una covarianza positiva, indicando una relación directa entre las variables. Sobre la correlación entre los datos obtenidos de ERITROPOYETINA Y PLAQUETAS no se pudo aplicar tal inferencia ya que el tamaño de la población fue insuficiente, sin embargo, el análisis descriptivo de nuestra población presenta variaciones importantes según lo presentado en los resultados.

El análisis inferencial por medio del cálculo del valor p con base a hipótesis nula y alterna no es aplicable por el tamaño de la muestra.

## **6.2 Niveles de Hematocrito y Hemoglobina**

Los datos del cuadro hemático automatizado, fueron recolectados a partir de un Coulter Microdiff 18 Series de Coulter Corporation. En la figura número 17 podemos observar los niveles de hematocrito y hemoglobina de cada uno de los individuos en estudio; encontrándose que el 78.1% de la población presenta un hematocrito menor del 39%. Mientras un 75% de la población muestra niveles inferiores a 11 g/dl de hemoglobina, lo cual indica que la mayoría de los individuos cumplen con los criterios de inclusión.

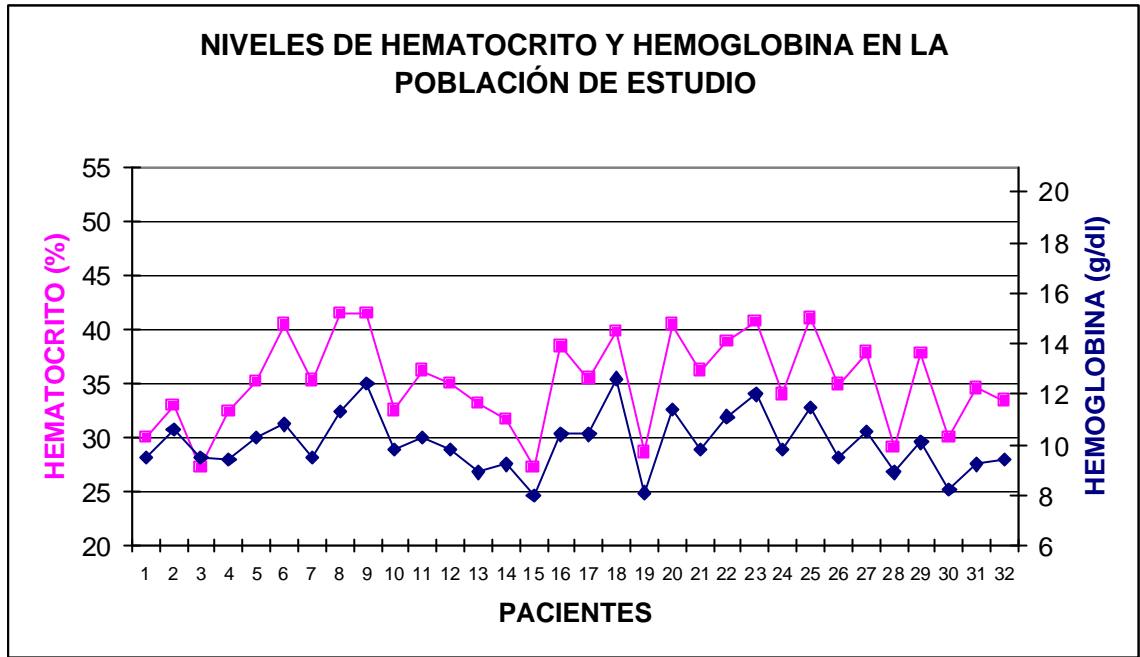


Figura 17 Distribución de la población de estudio para hematocrito y hemoglobina

### 6.3 Frotis de Sangre Periférica (FSP)

En las lecturas de los extendidos de sangre periférica se encontró que el 96.9% de la población de estudio presenta anisocitosis con presencia de eritrocitos microcíticos e hipocrómicos. La poiquilocitosis de los pacientes del estudio, reveló la presencia de un 54% de ovalocitos (Figuras 18 y 19)

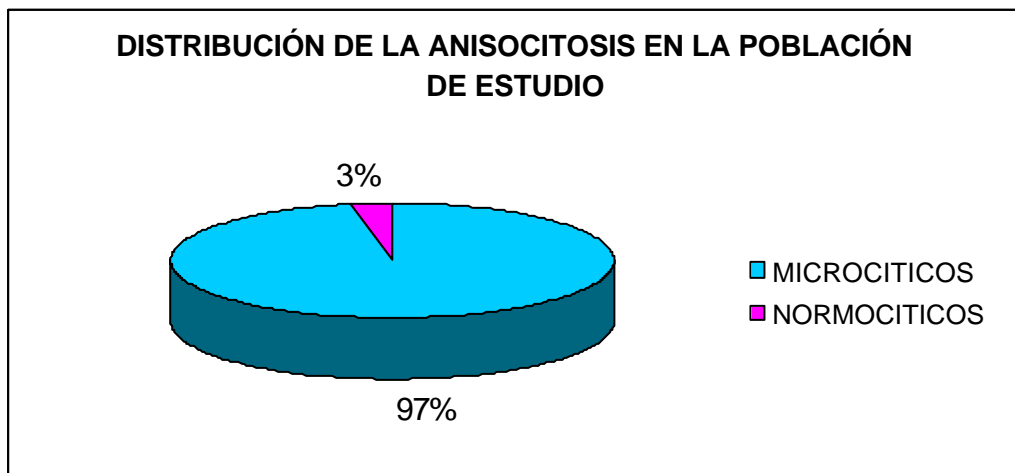


Figura 18 Anisocitosis en la población de estudio

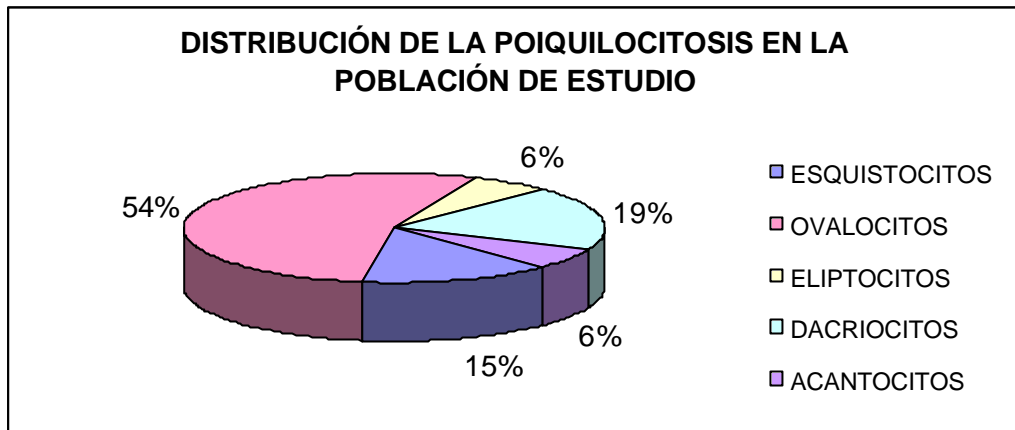


Figura 19 Poiquilocitosis en la población de estudio

#### 6.4 Evaluación de los Niveles de Hierro Sérico y TIBC

Como se mencionó anteriormente esta prueba fue realizada en un RA 50 Technicon Emes (espectrofotómetro), el cual mostró que un 62.5% de la población presentó niveles séricos bajos de hierro, un 25% niveles normales y un 12.5% niveles altos debido a que son pacientes en tratamiento con sales ferrosas (valores de referencia de 59 ug/dl a 158 ug/dl). En la prueba de capacidad de fijación de hierro de la transferrina, se encontró que un 53.1% de la población presenta niveles normales de éste parámetro, mientras que un 31.3% tiene niveles aumentados. (valores de referencia de 259 ug/dl a 388 ug/dl). (Figura 20)

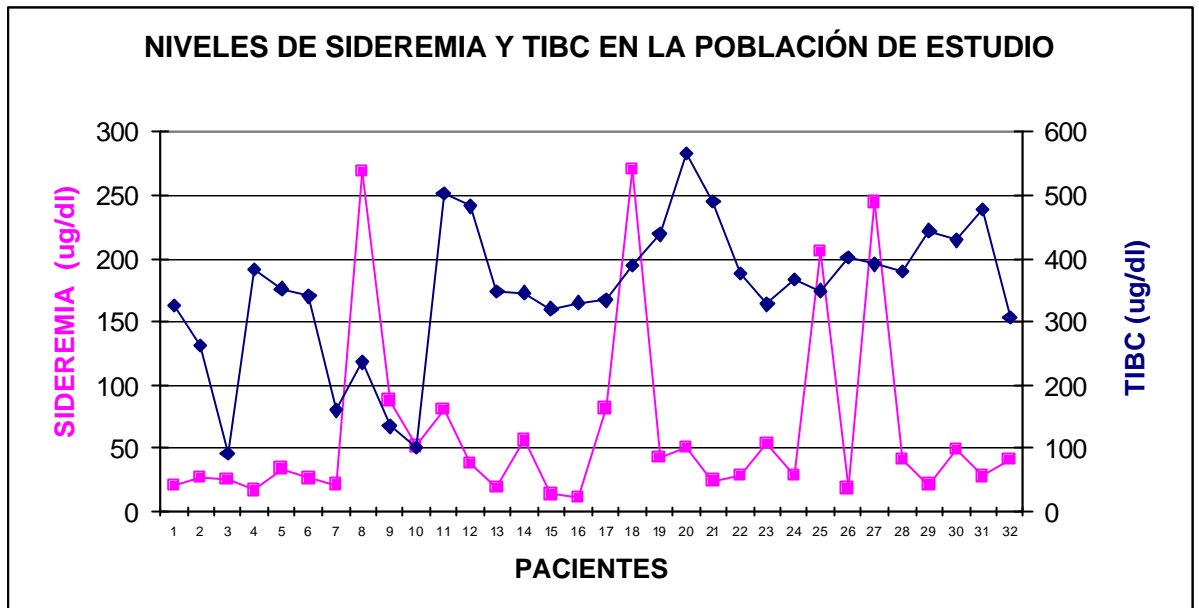


Figura 20. Niveles de sideremia y TIBC en la población de estudio

### 6.5 Agregometría Plaquetaria

Los datos observados en la prueba de agregometría plaquetaria fueron obtenidos de un analizador multifuncional de la agregación plaquetaria, Platelets Aggregation Chromogenic Kinetics System-4 (PACKS-4) de Helena Laboratories; se encontró que un 93.75% de la población presentó agregación normal al ser sometido a los cuatro agonistas, mientras un 6.25% presentó deficiencia en la agregación con epinefrina. La distribución de los porcentajes de agregación se observa en las figuras 21 y 22.

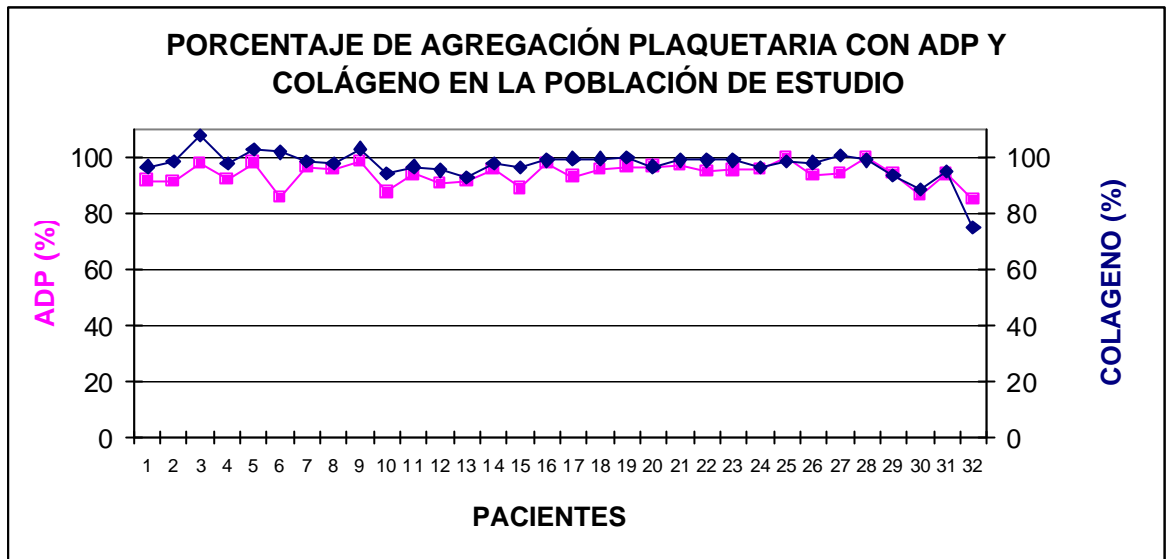


Figura 21 Agregación plaquetaria con ADP y colágeno en los individuos de estudio.  
 \*Según Helena Laboratories se considera una agregación normal cuando el porcentaje es mayor al 50%

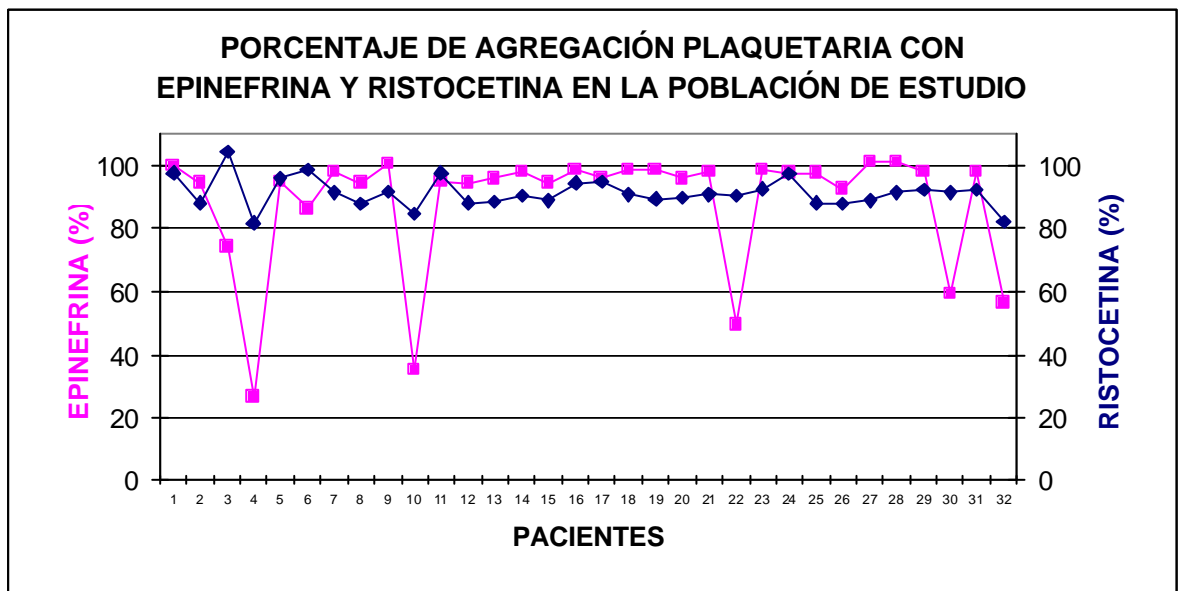


Figura 22. Agregación plaquetaria con epinefrina y Ristocetina en los individuos de estudio.  
 \*Según Helena Laboratories se considera una agregación normal cuando el porcentaje es mayor al 50%

## 6.6 Niveles Séricos de Eritropoyetina

El 65.7% de la población de estudio presenta niveles de eritropoyetina superiores a los valores de referencia (hasta 19 mU/ml). (Figura 23)

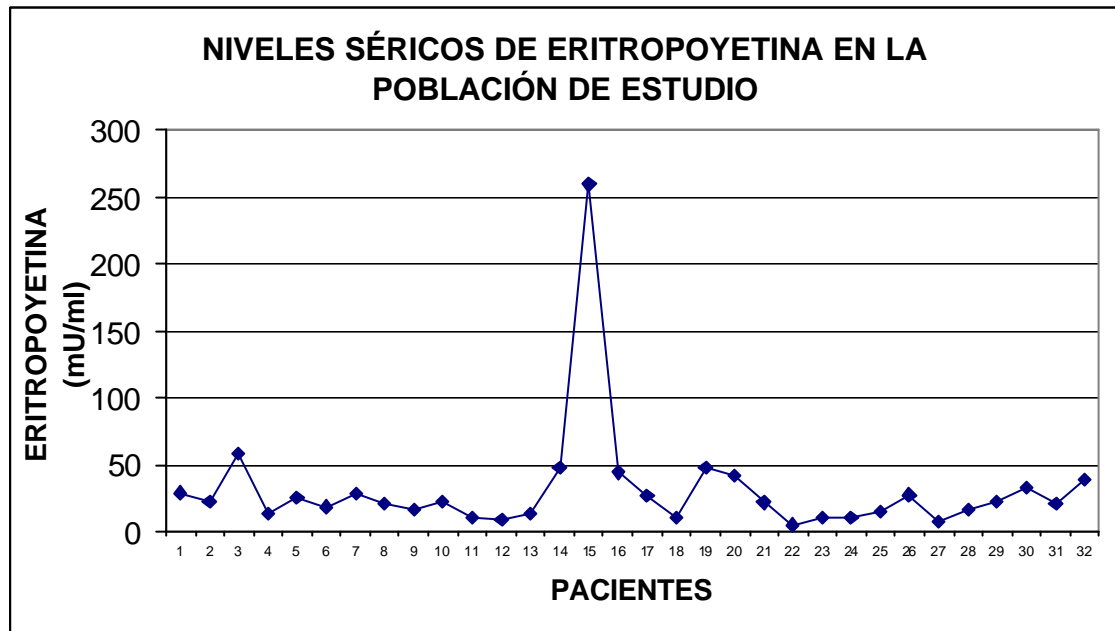


Figura 23. Niveles séricos de eritropoyetina en los individuos de estudio

### 6.6.1 Niveles Séricos de Eritropoyetina y Recuentos Plaquetarios

En la figura 24 podemos observar el comportamiento de los niveles de eritropoyetina y recuentos plaquetarios en cada uno de los individuos de estudio. Los niveles más altos de eritropoyetina corresponden a los pacientes número 3, 14, 15, 16, 19, 30 y 32 que presentan los niveles más bajos de hematocrito y hemoglobina y recuentos plaquetarios superiores a  $500000/\text{mm}^3$ .

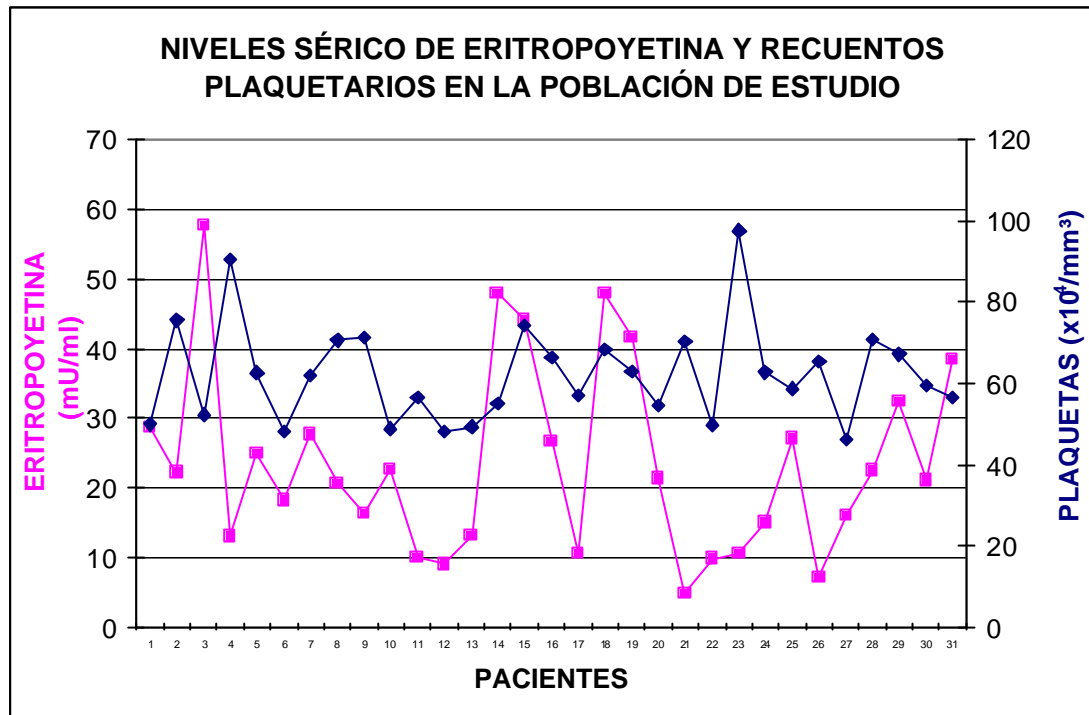
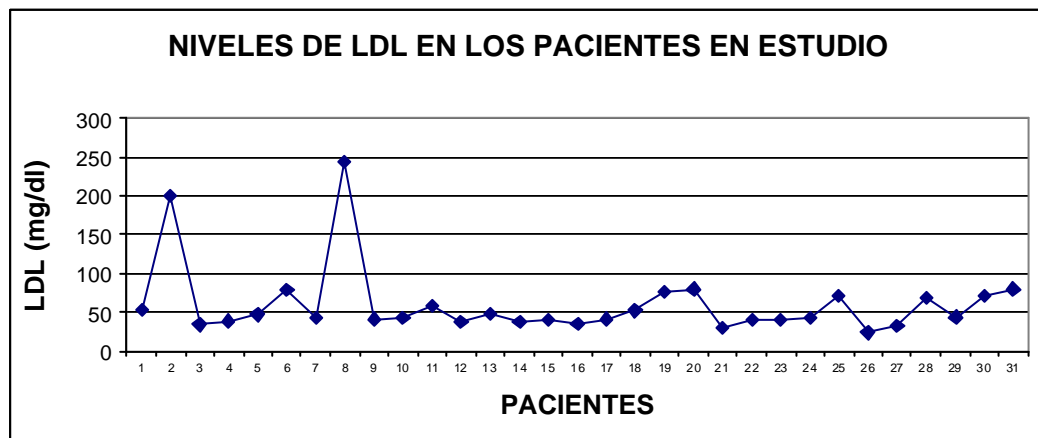


Figura 24 Niveles séricos de eritropoyetina y recuentos plaquetarios en la población de estudio

\*El paciente No. 15 no se encuentra en la grafica ya que el valor de eritropoyetina excede los valores de la escala.

### 6.7 COLESTEROL DE BAJA DENSIDAD (LDL)

La realización de esta prueba indica que el 96.8% de los pacientes presenta niveles de colesterol LDL bajos (Figura 25).



\*Paciente N° 8 muestra postprandial.

Figura. 25 Niveles de LDL en los pacientes en estudio

Todas las pruebas fueron procesadas junto con dos pacientes control los cuales estuvieron dentro de los valores de referencia de cada prueba comportándose como se esperaba.

## 7. DISCUSIÓN

En estudios realizados por Beguin se proponen tres mecanismos por medio de los cuales puede interactuar la eritropoyetina con la trombopoyesis así: 1) Un efecto directo de la eritropoyetina sobre los megacariocitos, con base en su homología estructural con la trombopoyetina y con los receptores de estas hormonas, 2) La respuesta global de la médula ósea, en donde se ha observado que en pacientes con enfermedad renal tratados con eritropoyetina humana recombinante no solo se aumentan las células eritroides si no que también ocurre un incremento en la CFU-Meg y la CFU-GM, lo que estimula la trombopoyesis y 3) La elevación de la eritropoyetina como compensación fisiológica de pacientes con anemia ferropénica, lo que conduce a la generación de una trombocitosis reactiva. En nuestra población de estudio se observó que la mayoría de los pacientes que presentaban recuentos plaquetarios altos, también mostraban niveles elevados de eritropoyetina, lo que indica posiblemente que el mecanismo que provoca el desarrollo de la trombocitosis reactiva en nuestros pacientes con anemia ferropénica es consecuencia de la acción compensatoria de la hormona que no solo conlleva al aumento de los índices eritrocitarios sino que también actúa sobre la producción plaquetaria, lo cual se correlaciona con el estudio realizado por Beguin.

En la población de estudio encontramos que trece de los individuos de estudio tienen niveles normales de eritropoyetina con recuentos plaquetarios aumentados, lo que nos lleva a pensar que el mecanismo de compensación de la eritropoyetina endógena no es el único proceso que actúa sobre éste fenómeno.

Adicionalmente a los hallazgos encontrados en nuestro estudio sobre la relación de los niveles de eritropoyetina y los recuentos plaquetarios, se plantea desde un principio en los objetivos específicos, explorar el comportamiento plaquetario en los pacientes con anemia ferropénica y trombocitosis con base en los indicios clínicos encontrados por el doctor Akins, que revelan que pacientes con anemia ferropénica y trombocitosis sin antecedentes de arteriosclerosis presentan trombos en la arteria carótida, lo que en su momento se postuló como una posible alteración cualitativa plaquetaria, tal vez algún fenómeno de hipercoagulabilidad. En nuestro estudio exploramos ésta posibilidad y encontramos que algunos pacientes presentan alteraciones de las plaquetas en la agregación frente a epinefrina, contrario a lo que se postula como un fenómeno de hipercoagulabilidad. En esta parte debemos puntualizar que las conclusiones obtenidas por el doctor Akins son teorías basadas en observaciones clínicas sin tener un fundamento experimental.

En la prueba de agregometría plaquetaria se registró que dos individuos del estudio no presentaron agregación satisfactoria frente a epinefrina, lo cual posiblemente indica que no se llevo a cabo adecuadamente el proceso de agregación plaquetaria, bien sea por el mecanismo de contractibilidad plaquetaria que no permite la liberación de calcio o no se facilita la sobre expresión de la glicoproteína IIb/IIIa inhibiendo la unión al fibrinógeno.

## 8. CONCLUSIONES

Gracias a los datos obtenidos en nuestra población podemos concluir que:

- a. La eritropoyetina juega un papel importante en la megacariopoyesis debido a un proceso compensatorio en presencia de anemia por deficiencia de hierro, dando como resultado la elevación en los recuentos plaquetarios (trombocitosis reactiva); sin embargo en esta investigación algunos de los pacientes que presentan trombocitosis reactiva no muestran niveles séricos aumentados de eritropoyetina, lo que sugiere que este no es el único mecanismo por el cual se eleva la producción plaquetaria asociada a este tipo de anemia.
- b. Nuestro estudio muestra que algunos de los individuos que participaron en esta investigación, presentaron alteraciones cualitativas en las plaquetas frente a epinefrina lo cual no corresponden a factores de riesgo protrombotico, sino más bien a una alteración hemostática.
- c. Existe algún proceso desconocido por el cual algunos de los pacientes del estudio presentan alteraciones en la agregación plaquetaria frente a epinefrina no superando el 50% de agregación.

## 9. RECOMENDACIONES

- a. El número de muestras obtenidas en esta investigación no permitió la aplicación de un estudio inferencial, lo cual revela la importancia de un tamaño de muestra adecuado; por lo tanto es recomendable que para obtener un estudio de este tipo se aumente el tamaño de muestra que permitirá generalizar las conclusiones obtenidas en la investigación.
- b. Para la continuación de este estudio es recomendable seguir utilizando el protocolo de manejo y procesamiento de muestras, ya que en esta investigación se logró cubrir todos los aspectos que se querían observar.
- c. Explorar con técnicas especiales de agregometría síndromes de plaqueta pegajosa y estados hipercoagulables.

## ANEXO 1

TABLA 1.

POBLACION SEGUN NIVELES DE SATURACION DE LA  
TRANSFERRINA SERICA, POR EDAD, COLOMBIA 1977-1980

GRUPO DE EDAD (AÑOS)	NIVEL NORMAL SAT. TRANSFERRINA		NIVELES DEFICIENTES			
			LEVES		MODERADOS A SEVEROS	
	Población	%	Población	%	Población	%
0.5-4	1.040.108	69.6	214.630	14.4	238.847	16.0
5-14	1.151.304	53.2	1.191.766	20.1	1.579.415	26.7
15-44	6.848.758	72.0	1.226.995	12.9	1.433.921	15.1
45-más	2.501.447	69.3	602.245	16.7	503.249	14.0
<b>Total</b>	<b>13.541.617</b>	<b>66.0</b>	<b>3.235.636</b>	<b>15.8</b>	<b>3.755.432</b>	<b>18.2</b>

(Estudio Nacional de Salud, Anemias Nutricionales, Mora y Rodríguez, 1986)

## ANEXO 2

TABLA 2

DEFICIENCIA DE HIERRO POR EDAD Y SEXO. TOTAL PAIS

COLOMBIA 1977-1980

GRUPO DE EDAD (AÑOS)	<i>HOMBRES</i>		<i>MUJERES</i>	
	<i>Población</i>	%	Población	%
0.5-4	284.232	34.4	169.245	25.3
5-14	1.490.722	47.7	1.280.459	45.7
15-44	1.119.415	23.6	1.541.501	32.3
45-más	421.531	24.3	683.963	36.6
<b>Total</b>	<b>3.315.900</b>	<b>31.8</b>	<b>3.675.168</b>	<b>36.4</b>

(Estudio Nacional de Salud, Anemias Nutricionales, Mora y Rodríguez, 1986)

## ANEXO 3

### INFORME DE CONSENTIMIENTO

Fecha \_\_\_\_\_

Yo \_\_\_\_\_, identificado con la cédula de ciudadanía No. \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ declaro que he sido informado de los siguientes aspectos concernientes al estudio sobre **ANEMIA FERROPENICA Y TROMBOCITOSIS** en el que participaré voluntariamente como sujeto:

1. Me será realizada una toma de muestra de sangre venosa, la cual no representa ningún riesgo para mi integridad física según se me explicó antes de ejecutar el procedimiento.
2. La sangre será utilizada para la obtención de plasma y posterior medición de citocinas, así como para realizar estudios sobre plaquetas. Esta muestra no será utilizada para ningún otro estudio sin mi consentimiento. Una fracción de la muestra del plasma será criopreservada por 1 año después de finalizado el estudio, posterior será destruida.
3. Los resultados personales me serán entregados y no podrán ser divulgados a mi nombre sin una autorización escrita de mi parte.
4. Los resultados del proyecto serán utilizados en estudios sobre ANEMIA FERROPENICA del laboratorio de Hematología del Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias (Pontificia Universidad Javeriana) y como datos para las publicaciones que de ella surjan en un medio de difusión estrictamente académico, conservándose en anonimato.
5. Los investigadores no obtendrán ningún beneficio económico de este proyecto sin mi consentimiento.
6. Que se me ha informado y estoy de acuerdo con los demás parámetros registrados en Artículo 15 de la resolución No. 008430 de 1993 (4 de Octubre de 1993) del Ministerio de Salud de la República de Colombia.

Yo \_\_\_\_\_, como sujeto del estudio me comprometo a que toda la información que brinde será ajustada a la verdad.

Declaro que estoy de acuerdo con lo anterior y que participo voluntariamente y no he sido sometido a ninguna intervención que coaccione física o moralmente esta decisión.

Firma

Testigo 1

Testigo 2

\_\_\_\_\_  
c.c.

\_\_\_\_\_  
c.c.

\_\_\_\_\_  
c.c.

HUELLA DIGITAL INDICE DERECHO

**ANEXO 4**

**ENCUESTA PARA INCORPORACIÓN DE PACIENTES AL ESTUDIO**

<b>FECHA:</b>	
<b>CONSECUTIVO:</b>	
<b>DATOS PERSONALES</b>	
<b>Nombres:</b>	_____
<b>Apellidos:</b>	_____
<b>Edad:</b>	_____
<b>Sexo:</b>	F ( ) M ( )
<b>Telefono:</b>	_____
<b>DATOS CLINICOS</b>	
<b>Tratamiento actual</b>	_____ _____
<b>Medicamentos</b>	_____
<b>Transfusiones</b>	Si ( ) No ( )
<b>Cirugías</b>	Si ( ) No ( )
<b>Embarazo</b>	Si ( ) No ( )
<b>Lactancia</b>	Si ( ) No ( )
<b>Posparto</b>	Si ( ) No ( )
<b>INSTITUCION</b>	

## ANEXO 5

### FROTIS DE SANGRE PERIFERICA

Nombre: \_\_\_\_\_

Consecutivo: \_\_\_\_\_

**Recuento Diferencial de Leucocitos:**

Neutrófilos: \_\_\_\_\_  
Monocitos: \_\_\_\_\_

Linfocitos: \_\_\_\_\_  
Eosinofilos: \_\_\_\_\_

Basófilos: \_\_\_\_\_

**Recuento Indirecto Plaquetario:**

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	total	recuento
										X 21000	Xmm3

**Morfología Eritrocitaria**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	promedio
<b>Anisocitosis</b>											
<b>Poiquilocitosis</b>											
<b>Hipocromia</b>											

FSP: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

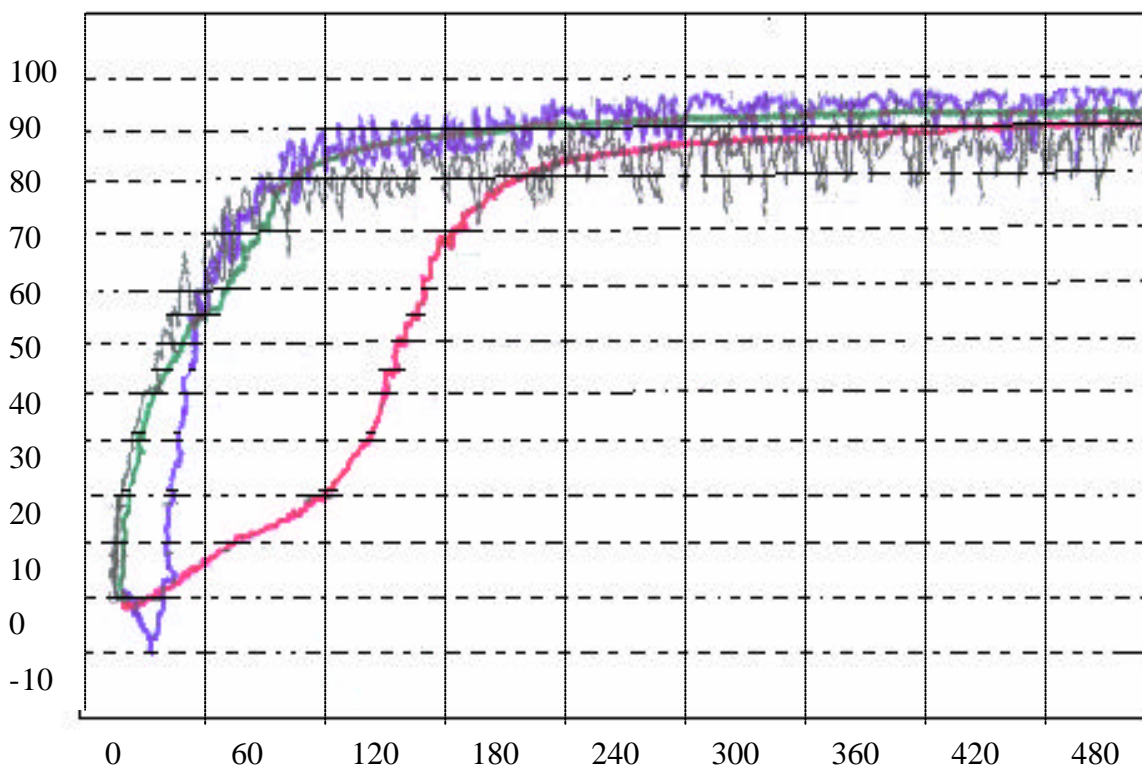
## ANEXO 6



### CENTRO JAVERIANO DE ONCOLOGÍA

CONSECUTIVO: No.36  
 FECHA: MAYO 14 DE 2002  
 SEXO: FEMENINO  
 MEDICAMENTOS: NINGUNO

EDAD: 23AÑOS  
 PLAQUETAS: 627.000/mm<sup>3</sup>



CH NO.	REAG LOT#	REAG CONC	UNIT	PPP	PRP	MAX %	MAX TIME	SLP1	SLP2	LAG
Ch.1		ADP	uM	0.076	0.766	98.2	364 sec	85.2	N/A	3sec
Ch.2		EPN	uM	0.073	0.551	95.0	530 sec	60.5	N/A	8sec
Ch.3		COLL	ug/ml	0.083	0.534	102.7	545 sec	130.0	N/A	27sec
Ch.4		RIST	ug/ml	0.067	0.722	95.9	586 sec	99.7	N/A	3sec

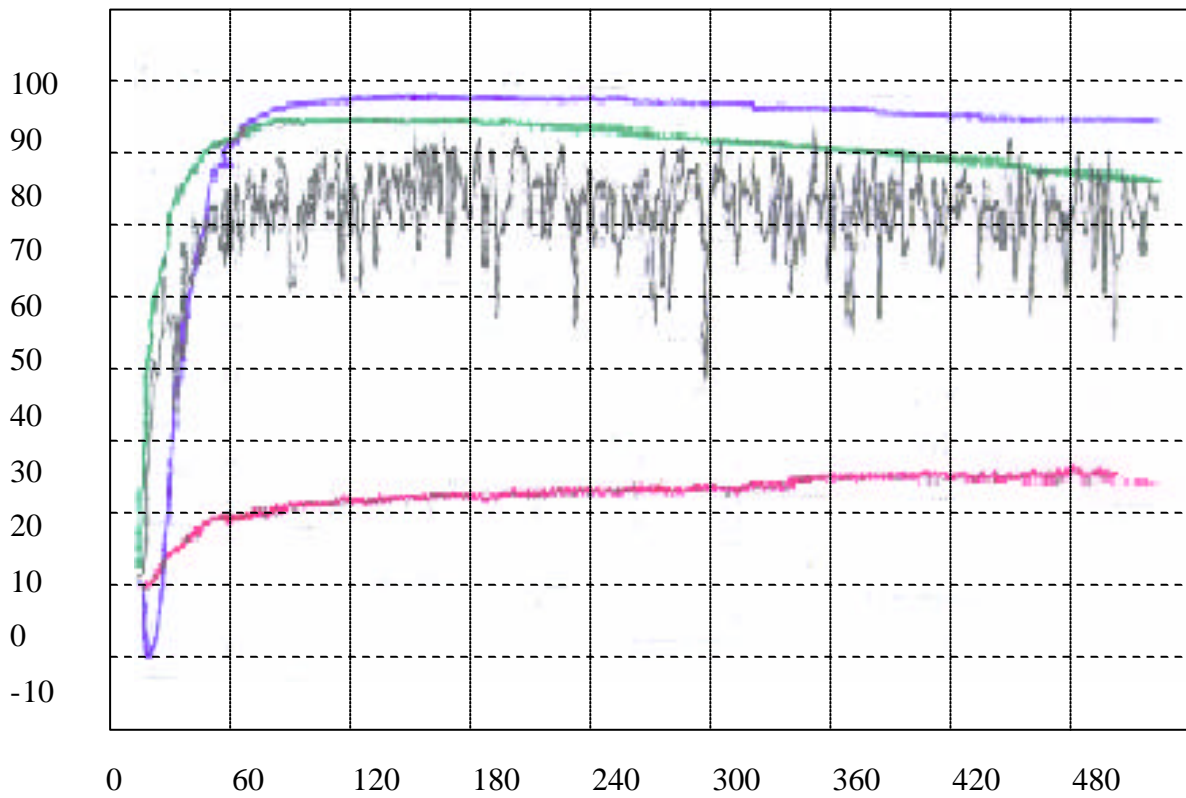
## ANEXO 7



### CENTRO JAVERIANO DE ONCOLOGÍA

CONSECUTIVO: No.35  
 FECHA: MAYO 6 DE 2002  
 SEXO: FEMENINO  
 MEDICAMENTOS: NINGUNO

EDAD: 23AÑOS  
 PLAQUETAS: 907.000/mm<sup>3</sup>



CH NO.	REAG LOT#	REAG	CONC	UNIT	PPP	PRP	MAX %	MAX TIME	SLP1	SLP2	LAG
Ch.1		ADP		uM	0.063	0.939	92.3	216 sec	93.4	N/A	4sec
Ch.2		EPN		uM	0.068	0.803	26.4	808 sec	14.9	N/A	10sec
Ch.3		COLL		ug/ml	0.056	0.747	97.7	270 sec	122.6	N/A	25sec
Ch.4		RIST		ug/ml	0.031	0.793	81.8	255 sec	63.0	N/A	4sec

## BIBLIOGRAFIA

1. Abramson, S. y Abramson, N. 1999. Common Uncommon Anemias. *American Family Physician*. 59(4):851-858.
2. Akan, H. Güven, N., Aydogdu, I., Arat, M., Beksaç, M. y Dalva, K. 2000. Thrombopoietic Cytokines in Patients with Iron Deficiency Anemia with or without Thrombocytosis. *Acta Haematologica*. 103:152-156.
3. Akins, P., Glenn, S., Nemeth, P. y Dedeyn, C. 1996. Carotid Artery Thrombous Associated With Severe Iron-Deficiency Anemia and Thrombosis. *Stroke*. 27(5):1002-1005.
4. Andrews, N. 1999. Disorders of Iron Metabolism. *The New England Journal of Medicine*. 341(26):1986-1995.
5. Beguin, Y. 1999. Erythropoietin and Platelet Production. *Haematologica*. 84:541-547.
6. Beutler, E. 1988. The Common Anemias. *JAMA*. 259(16):2433-2437.
7. Broudy, V., Lin, N., Sabath, D., Papayannopoulou, T. y Kaushansky, K. 1997. Human Platelets Display High Affinity Receptors for Thrombopoietin. *Blood*. 89(6):1896-1904.
8. Brugnara, C., Zurakowski, D., DiCanzio, J., Boyd, T. y Platt, Orah. 1999. Reticulocyte Hemoglobin Content to Diagnose Iron Deficiency in Children. *JAMA*. 281(23):2225-2230.

9. Ebert, B. y Bunn, F. 1999. Regulation of the Erythropoietin Gen. Blood. 94(6):1864-1877.
10. Freire, W. 1998. La Anemia por Deficiencia de Hierro: Estrategias de la OPS/OMS para Combatirla. Salud Pública de Mejiro. 40(2): 199-205.
11. Frewin, R., Henson, A. y Provan D. 1997. ABC of Clinical Haematology: Iron Deficiency Anaemia. British Medical Journal. 314(7077):360.
12. Georges, J. 2000. Platelets. The Lancet. 355:1531-1539.
13. Goodnough, L., Skiken, B. y Brugnara, C. 2000. Erythropoietin, iron and erythropoiesis. Blood. 96(3):823-833.
14. Gordon, M. y Hoffman, R. 1992. Growth Factors Affecting Human Thrombocytopoietins: Potential Agents for the Treatment of Thrombocytopenia. Blood. 80(2):302-307.
15. Gualandro, S. 2000. Diagnóstico Diferencial das Anemias. Journal Brasil Nefrology. 22(Supl 5):7-10.
16. Harker, L., Roskos, L., Marzec, U., Carter, R., Cherry, J., Sundell, B., Cheung, E., Terry, D. y Sheridan W. 2000. Effects of Megakaryocyte Growth and Development Factor Life Span, and Platelet Function in Healthy Human Volunteers. Blood. 95(8):2514-2522.
17. Jilma, P., Dzirlo, L., Hergovich, N., Lackner, E., Mensik, C., Eichler, H., Kabma, E., Geissler, K y Jilma, B. 2000. Effects of

- erythropoietin on platelet reactivity and thrombopoiesis in humans. *Blood*. 95(9):2983-2989.
18. Karpatkin, S., Garg, S., Freedman, M. 1974. Role of Iron as a Regulator of Thrombopoiesis. *The American Journal of Medicine*. 57 (4): 521-525.
19. Kausshansky, K. 1998. Thrombopoietin and the Hematopoietic Stem Cell. *Blood*. 92(1): 1-3.
20. Krantz, S. 1991. Erythropoietin. *Blood*. 77(3):419-434.
21. Lacombe, C., Mayeux, P. 1998. Biology of Erythropoietin. *Haematologica*. 85:724-732.
22. Loo, M. y Beguin, Y. 1999. The Effect of Recombinant Human Erythropoietin on Platelets Counts is Strongly Modulated by the Adequacy of Iron Supply. *Blood*. 93(10):3286-3293.
23. Miyakawa, Y., Oda, A., Druker, B., Miyazaki, H., Handa, M., Ohashi, H. E Ikeda, Y. 1996. Thrombopoietin Induces Tyrosine Phosphorylation of Stat3 and Stat5 in Human Blood Platelets. *Blood*. 87 (2): 439-446.
24. Mora y Rodríguez, 1986. Anemias Nutricionales, Estudio Nacional de Salud. pág 49-53.
25. Norol, F., Vitrat, N., Cramer, E., Guichard, J., Burstein, S., Vainchenker, W. y Debili, N. 1998. Effects of Cytokines on Platelet Production From Blood and Marrow CD34+ Cells. *Blood*. 91(3):830-843.

26. Oski, F. 1993. Iron Deficiency In Infancy and Childhood. The New England Journal of Medicine. 329(3):190-193.
27. Park, H., Park, S., Jin, E., Song, J., Ryu, S., Yu, M. y Hong, J. 1998. Identification of Functionally Important Residues of Human Thrombopoietin. The Journal of Biological Chemistry. 273(1):256-261.
28. Rao, G. 1997. Epinephrine and Platelets Function. Journal Laboratory Clinical Medicine. 130:238-239.
29. Rojnuckarin, P., Drachman, J. y Kaushansky, K. 1999. Trombopoietin Induced Activation of the Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) Pathway in Normal Megakaryocytes: Role in Endomitosis. Blood. 94(4): 1273-1282.
30. Roy, C. y Enns, C. 2000. Iron Homeostasis: New Tales From the Crypt. Blood. 96(13):4020-4027.
31. Solar, G., Kerr, W., Zeigler, F., Hess, D., Donahue, C., Sauvage, F. y Eaton, D. 1998. Role of c-mpl in Early Hematopoiesis. Blood. 92(1): 4-10.
32. Suominen, P., Punnonen, K. Rajamäki, A. y Irjala, K. 1998. Serum Transferrin Receptor and Transferrin Receptor-Ferritin Index Identify Healthy Subjects With Subclinical Iron Deficits. Blood. 92(8):2934-2939.
33. Szafarc, S. y Souza, S. 1997. Prevalence and Risk Factors in Iron Deficiency and Anemia. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 47(2):35-38.

34. Takatoku, M., Kametaka, M., Shimizu, R., Miura, Y. y Komatsu, N. 1997. Identification of Functional Domains of the Human Thrombopoietin Receptor Required for Growth and Differentiation of Megakaryocytic Cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 272(11):7259-7263.
35. Tugal, O., Jacobson, R., Berezin, S., Foreman, S., Berezin, S., Brudnicki, A., Godine, L., Davidian, M., Jayabose, S. y Escobedo, V. 1994. Recurrent Benign Intracranial Hypertension Due to Iron Deficiency Anemia. *The American Journal of Pediatric Hematology Oncology*. 16(3):266-270.
36. Villanueva, V. 2001. Diagnóstico de las Anemias. *Revista de Posgrado de la Cátedra Via Medicina*. 107.
37. Vitrat, N., Cohen-Solal, K., Le Couedic, J., Norol, F., Larsen, A., Katz, A., Vainchenker, W. y Debili, N. 1998. Endomitosis of Human Megakaryocytes Are Due to Abortive Mitosis. *Blood*. 91(10): 3711-3723.
38. Wang, J., Chen, C., Novetsky, A., Lichter, S., Ahmed, F. y Friedberg, N. 1998. Blood Thrombopoietin Levels in Clonal Thrombocytosis And Reactive Thrombocytosis. *The American Journal of Medicine*. 104 (3): 451-455.
39. Wheby, M. 1980. Effect of Iron Therapy on Serum Ferritin Levels in Iron-Deficiency Anemia. *Blood*. 56 (1): 138-140.