

**ALTERACIONES EN EL PATRON DE APOPTOSIS DE CELULAS PRECURSORAS DE ERITROCITOS EN MUJERES POSTMENOPAUSICAS CON ERITROCITOSIS PATOLÓGICA DE LA ALTURA.**

**Alterations in the Apoptosis Pattern of Erythrocytes Precursors Cells of Postmenopausal Women With High Altitude Erythrocytosis**

Arias A. Amari R. Navia P. Rodrigo G. Peñaloza R. \*

Torrez G. Vazquez A. Cuevas H.

Correspondencia y reprints a : Dr. Ricardo Amari

e-mail : cdumusa@ceiba.entelnet.bo

**RESUMEN**

**PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.**

¿Existen alteraciones en el patrón de apoptosis de células precursoras de eritrocitos en mujeres postmenopausicas con Eritrocitosis Patológica de la Altura?

**OBJETIVOS.**

Determinar la existencia de alteraciones en el patrón de apoptosis de células precursoras de eritrocitos en mujeres postmenopausicas con Eritrocitosis Patológica de la Altura.

**DISEÑO.**

Corte transversal

**LUGAR.**

Unidad de Biología Molecular Paolo Belli, Instituto de Genética, Facultad de Medicina, UMSA.

**POBLACIÓN.**

Dos pacientes mujeres postmenopausicas diagnosticadas con EPA según criterios clínico-laboratoriales, sin sobrepeso ni enfermedades cardiopulmonares, no fumadoras y que no recibían tratamiento hormonal. El grupo control estuvo conformado por 4 mujeres de iguales características sin EPA.

**MÉTODOS.**

Las células mononucleadas de la médula ósea fueron separadas en medio LSM y se cultivaron en medios líquidos en presencia y ausencia de Eritropoyetina. De estos cultivos se recuperaron las células a 1, 2, 7 y 14 días de cultivo, a partir de estas células se realizaron 2 frots para la evaluación de la apoptosis por morfología y el remanente celular fue empleado en el análisis de la formación del DNA degradado. Finalmente los resultados fueron sujeto de test de significancia.

**RESULTADOS.**

La morfología y el DNA degradado detectaron un retardo del patrón de apoptosis, de los progenitores eritroides, en las dos pacientes con EPA estudiadas; donde el porcentaje de células apoptóticas tiende a mantenerse constante en función del tiempo, en lugar de incrementarse, como ocurre en los controles (p 0,00). El patrón de apoptosis en los controles es EPO dependiente, observándose una diferencia significativa entre los cultivos con y sin EPO (p 0,00); mientras que en los pacientes es no EPO dependiente (p 0,23).

**CONCLUSIONES.**

El patrón de apoptosis modificado en los pacientes es indicativo de la presencia de alteraciones en la sobrevivencia celular y el incremento de la tasa de producción de progenitores eritroides durante la diferenciación EPO dependiente, posiblemente sean factores etiopatogénicos de la eritrocitosis.

**PALABRAS CLAVE.**

Eritrocitosis Patológica de la Altura, Apoptosis, Eritropoyetina, Eritroblasto basófilo, Eritroblasto ortocromático, Eritroblasto policromático, DNA degradado, Progenitores eritroides.

**SUMMARY**

**RESEARCH QUESTION.**

¿Are there any alterations in the apoptosis pattern of Erythrocytes Precursor Cells of postmenopausal women with High Altitude Erythrocytosis?

**OBJETIVES.**

Determine the existence of alterations in the apoptosis pattern of Erythrocytes Precursor Cells of postmenopausal women with High Altitude Erythrocytosis (EPA).

**DESIGN.**

Case and controls.

**LOCATION.**

Paolo Belli's Molecular Biology Unit, Genetic Institute, Medicine School, UMSA.

**POPULATION.**

2 postmenopausal female patients with EPA diagnosis according to laboratory-clinic criteria, without overweight nor cardiac-respiratory sicknesses, non smokers and non receivers of hormonal treatment. The control group consisted in 4 female women with the same characteristics but without EPA.

**METHODS.**

The mononucleated cells of bone marrow were separated in LSM medium and cultivated in liquid medium with or without Erythropoietin. From these cultures cells were recovered at 1, 2, 7 and 14 days of culture, with these cells 2 smears were made for the apoptosis evaluation and the cell remainin was used for the DNA ladder formation. Finally the results were subject of a signicancy test.

**RESULTS.**

The DNA ladder and morphology detected a delayed apoptosis pattern in the erythroid progenitors of the 2 patients with EPA. In these patients the percentage of apoptotic cells tends to be constant according to the time, instead of increasing as it happens in controls (p 0,00). In the controls the apoptosis pattern is EPO dependent, having a significative difference between the cultures with or without EPO (p 0,00), while in the patients is not EPO dependent (p 0,23).

**CONCLUSIONS.**

This modify apoptosis pattern in patients would be an indicative of the presence of alterations in the cell survivable of erythroid progenitors; so is possible that by increasing the time of life of these cells the erythrocytes production rate increases, characterist of this sickness.

**KEY WORDS.**

High Altitude Erythrocytosis (EPA), Apoptosis, Erythropoietin, Basofil Erythroblast, Ortocromatic Erythroblast, Policromatic Erythroblast, DNA ladder, Erythroid progenitors.

\*Facultad de Medicina UMSA, Instituto de Genética, Unidad de Biología Molecular Paolo Belli, Av. Saavedra No. 2246 La Paz Bolivia

## INTRODUCCIÓN

La función principal de los eritrocitos es transportar el oxígeno desde los pulmones a otros tejidos. Esta función es llevada a cabo gracias a la presencia de hemoglobina en su citoplasma, de manera que la cantidad de oxígeno llevada a los tejidos, en condiciones normales, está controlada por el número de eritrocitos en circulación y el flujo sanguíneo. Sin embargo se ha de considerar que los eritrocitos deben ser continuamente reemplazados para mantener, la distribución normal de oxígeno. Cuando la oxigenación tisular disminuye (hipoxia) o se incrementa, en comparación al nivel normal, se presentan ajustes en la tasa basal de producción de eritrocitos. Esta producción de eritrocitos está regulada principalmente por la hormona Eritropoyetina (EPO); que estimula a los precursores eritroides para su sobrevivencia, proliferación y diferenciación. En condiciones normales el aumento del nivel de EPO es la respuesta a la hipoxia tisular.<sup>(1)</sup>

Los nativos de altura sufren procesos de aclimatación en respuesta a la hipoxia de altura, que involucran un incremento en la concentración de EPO sérica con relación a la concentración presente en individuos que viven a nivel del mar.<sup>(2)</sup> Sin embargo en algunos nativos de altura se presenta una desregulación de la eritropoyesis con eritrocitos y hemoglobina muy altos, condición denominada Eritrocitosis Patológica de la Altura (EPA).

Inicialmente conocida como enfermedad de Monge, la Eritrocitosis Patológica de la Altura (EPA) es una pérdida de adaptación crónica a la altura, que tiene como principal característica el incremento exclusivo de la serie roja, lo que lleva a un aumento de la hemoglobina y el hematocrito; su etiopatogenia y los mecanismos fisiopatológicos aún siguen siendo estudiados.

Los mecanismos fisiopatológicos relacionarían al incremento de eritrocitos con el aumento de EPO sérica; sin embargo, el grupo de Leon-Velarde et al.<sup>(3)</sup> reportó niveles de eritropoyetina normales para pacientes con EPA, que probablemente presenten mecanismos alternativos al control de EPO para la producción de eritrocitos. Sin embargo, en base a las características de la enfermedad es posible plantear su relación con: a) el desgaste de algún mecanismo fisiológico, b) la activación o inhibición de algún mecanismo genético, c) alguna alteración genética o d) la combinación de estos procesos. La apoptosis es una forma de muerte celular programada que determina

la desaparición de la célula sin causar un proceso inflamatorio. Su estudio permite una evaluación general de la sobrevivencia, crecimiento y ciclo celular. Las células neoplásicas, independientemente de la causa genética, presentan una desregulación en la proliferación y diferenciación celular cuyo crecimiento se refleja en un retardo de la apoptosis. Es más se ha encontrado alteraciones del patrón de apoptosis en enfermedades oncohematológicas como las leucemias y eritrocitosis familiares<sup>(4)</sup>.

Según el modelo de Koury et al.<sup>(5)</sup> en la eritropoyesis se producen células en exceso y la EPO funciona como regulador apoptótico; posiblemente la falla de este mecanismo sea una de las causas de la EPA.

En el presente trabajo se pretende identificar alteraciones en el patrón de apoptosis de las células precursoras de eritrocitos de pacientes con EPA que explicaría la acumulación y sobreproducción de eritrocitos característica de esta enfermedad.

## METODOLOGÍA

## DISEÑO DE INVESTIGACIÓN.

Para determinar la existencia de una alteración en el patrón de la apoptosis en Eritrocitosis Patológica de la Altura se asumió un diseño de corte transversal.

## POBLACIÓN

Para un estudio poblacional de diseño descriptivo en la ciudad de La Paz, la obtención del tamaño de muestra se realizó en el paquete de estadística EPI-INFO versión 6.0 para un intervalo de confianza estimado del 95% una potencia estimada de la prueba del 80%, una frecuencia esperada de 65% y un error aceptable de 2% se determinó un tamaño muestral de 6 individuos con una relación entre casos y controles: 1:2 (2 pacientes : 4 controles).

Los casos del presente estudio fueron 2 mujeres post menopausias de 50 años diagnosticadas con Eritrocitosis Patológica de la Altura primaria por clínica, estudios de gabinete y de laboratorio. Los sujetos control fueron 4 mujeres post menopausica entre 43 y 70 años. Los sujetos de estudio residen en la ciudad de La Paz desde, por lo menos, 5 años atrás, A la fecha de la toma de muestra ninguna de las pacientes recibía tratamiento, ni presentaban obesidad, ni enfermedad cardiorrespiratoria o enfermedades neoplásicas.

**MUESTRAS DE ESTUDIO**

Se tomaron 3 a 5 ml de aspirado medular en tubos vacutainer (MSB) con EDTA K3 ; las células mononucleadas fueron separadas en medio LSM y el número de células viables se determinó por el método del azul tripan.

**EVALUACIÓN DE LA APOPTOSIS**

Para la evaluación del patrón de apoptosis se cultivaron  $5-7 \times 10^6$  células mononucleadas/mL en medio líquido de RPMI (70 %) con Suero Fetal Bovino (30 %), estreptomina (60 ug/ml) y penicilina (222,22 U/ml) a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>. Se sembró en 8 pocillos de placas de cultivo CCW (Corning Cell Well) ; a 4 se añadió EPO (la rEPO de Boehringer Mannheim GmbH, Almer de Noruega) a concentración 0,5 U/mL y los 4 restantes sin EPO . De la fracción remanente de las células mononucleadas se extrajo DNA cromosomal, para control del DNA degradado a 0 horas. A las 24 h, 48 h, 7 días y 14 días de cultivo se colectaron las células de un pocillo sin EPO y otro con EPO, de estas células para la evaluación de la morfología se realizaron 2 frotis que se sometieron a tinción May-Grunwald-Giemsa, determinándose el número de células apoptóticas sobre el total, finalmente, del remanente celular se realizó extracción del DNA (SDS 1% y proteinasa K 200 ug/ml) para la evaluación del DNA degradado.

Los DNAs fueron sometidos a electroforesis en agarosa al 1% en buffer TBE 1X, 100 V por 45 minutos; visualizándose los productos con bromuro de etidio a luz UV. <sup>(6)</sup>

**ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS**

Los datos obtenidos fueron ingresados en el programa STATA 6.0. Los valores reportados como porcentajes o variables continuas (Porcentaje de apoptosis y porcentajes de eritroblastos ortocromáticos y policromáticos) fueron sujetos de las pruebas "t" de Student, obteniéndose el "p" de significancia. Para la variable dicotómica (DNA degradado) se empleó el  $\chi^2$ , para obtener el coeficiente p de significancia.

**RESULTADOS**

Las características de los sujetos estudiados se detallan en la tabla 1. El análisis de t student para las variables edad e índice de masa corporal no detectó una diferencia significativa ; por tanto, los grupos son comparables.

**DETERMINACIÓN DEL PATRÓN DE APOPTOSIS****MORFOLOGÍA DE LAS CÉLULAS EN CULTIVO LÍQUIDO**

Las placas obtenidas no muestran células progenitoras basales, presentándose estadios de diferenciación a partir del eritroblasto basófilo. Tanto en los pacientes como en los controles los eritroblastos basófilos se presentaron en escaso número, siendo la mayoría de las células eritroblastos policromáticos y ortocromáticos e incluso ortocromáticos en enucleación. (Fig. 1). A pesar de las restricciones del medio líquido algunos eritroblastos de los pacientes presentaron división celular. (Fig. 2). Hecho evidenciado por la presencia de células mitóticas con citoplasma ligeramente azul y gránulos rojos similares a los de los eritroblastos policromáticos. Las células necróticas se presentaron como grandes vesículas amorfas sin estructuras internas y también se observaron los núcleos enucleados en el precipitado de la preparación.

La morfología característica de los eritroblastos apoptóticos dependió del estadio de apoptosis en el que se hallaban. En un inicio las células se encogían y sus membranas nucleares empezaban a desaparecer. Luego el núcleo se desorganizaba y la cromatina liberada invadía el citoplasma, dando a toda la célula una coloración rosada a lila. Luego se observó la aparición de grupos de citoplasma y cromatina con límites diferenciados. Entonces se presentó la aparición de membranas que envolvían a estos grupos formando vesículas o cuerpos apoptóticos. Posteriormente las vesículas de estas células se separaron y fueron liberadas en el medio. Algunas células en las que ya se había iniciado la liberación de los cuerpos apoptóticos, al realizar el frotis, estos cuerpos se extendían de manera que se observaron como grupos de vesículas aplanadas. (Fig.2).

El patrón de apoptosis de los controles implicó la muerte progresiva de las células, de manera que a los 14 días de cultivo, fue muy rara la presencia de células no apoptóticas. Patrón diferente al observado en los pacientes, en los que el porcentaje de muerte celular se mantuvo casi constante a lo largo de los 14 días de cultivo. (Fig. 3 y Fig. 4).

En los controles, se presentó una mayor sobrevivencia celular en presencia de EPO que demuestra el esperado carácter EPO dependiente de la línea eritroide ; sin embargo para los 7 días y 14 días casi todas las células presentaron apoptosis ; los valores de los cultivos sin y con EPO son similares (96 vs. 95% 7 días; 99 vs. 98 % a los 14 días).

En los pacientes la muerte celular no sobrepasó el 28% aún a los 14 días de cultivo (Fig. 6). La población de eritroblastos sobrevivientes tendía a mantenerse constante a lo largo del tiempo y los valores de apoptosis presentados en presencia y en ausencia de EPO no tenían diferencias significativas entre sí.

Tanto en los pacientes como en los controles los eritroblastos policromáticos constituyeron del 9 al 27% de la población en las primeras 24 horas de cultivo; en los controles a mayor tiempo de cultivo este porcentaje fue disminuyendo debido a la muerte por apoptosis de estas células; mientras que en los pacientes se mantenían constantes. En los controles los ortocromáticos a las 24 horas de cultivo eran del 40 al 57% y en los pacientes 67%, presentando una tendencia similar a los eritroblastos policromáticos.

#### DNA DEGRADADO

En el patrón de apoptosis de los controles, en ausencia de EPO el barrido de DNA se presenta desde las 24 horas de cultivo y en presencia de EPO a partir de las 48 horas; en ambos casos el tamaño de la mayoría de los fragmentos degradados superaba las 600 pares de bases, a partir de este valor se observaron bandas de menor nitidez de hasta 200 pares de bases. (Fig. 7: A). En los pacientes la degradación del DNA fue muy baja y no se pudo detectar con la tinción bromuro de etidio. (Fig. 7: B, C y D). La comparación estadística entre control y los pacientes, considerándose como valor 0 el patrón normal y 1 al patrón modificado, fue  $p = 0,014$ .

#### DISCUSION

El presente trabajo se llevó a cabo sobre una población femenina post menopáusica, para evitar la influencia hormonal (progesterona y estrógenos) que podría influir en la eritropoyesis, por el mecanismo de la hiperventilación y a nivel molecular inhibiendo el factor de transcripción GATA 1 que promueve la mitosis (7,8).

El patrón normal de apoptosis observado a las 24 horas comprende la muerte del 16,83% de las células en presencia de EPO y la muerte de 32,46% en ausencia de EPO. Las células que sobreviven hasta las primeras 24 horas corresponden a las progenitoras y precursoras activadas por EPO en la médula; y en el caso de los cultivos con EPO se incluyen a las células activas por la hormona en el medio. En los cultivos sin EPO a 48 horas, 7 y 14 días la ausencia de la hormona determina que las células pasen a un estado inactivo en el que no se expresan las proteínas de

sobrevivencia celular, de manera que las células mueren por apoptosis. Presentándose casi una totalidad de células apoptóticas en el cultivo de 14 días sin EPO, datos que coinciden con lo observado por Yu et al. (9). En el caso de los cultivos con EPO el mayor tiempo de cultivo disminuye la concentración de EPO, esto por que una fracción es consumida por las células y por que la EPO no es estable en el medio y se va degradando. Entonces es normal el incremento del porcentaje de apoptosis a las 48 horas que se acentúa a los 7 y 14 días de cultivo. Estos últimos valores son similares a los valores del cultivo sin EPO, probablemente debido a la degradación de la hormona. Por tanto, en los controles se detecta una diferencia estadística a las 24 y 48 horas entre los cultivos sin y con EPO ( $P > |t|$  0,0002 y  $P > |t|$  0,0000 respectivamente); mientras que a los 7 y 14 días de cultivo la diferencia no es estadísticamente significativa ( $P > |t|$  0,6634 y  $P > |t|$  0,5802 respectivamente).

En los pacientes estudiados se observa una disminución del porcentaje de células apoptóticas que se hace evidente a las 48 horas, 7 y 14 días de cultivo. En ambos pacientes no existió una diferencia significativa entre los cultivos con y sin EPO ( $P > |t|$  0,2267;  $P > |t|$  0,8860;  $P > |t|$  0,0677 y  $P > |t|$  0,7867 para 1, 2, 7 y 14 días de cultivo respectivamente). Esto indicaría que en la línea eritroide de estos pacientes, la EPO no desempeña un rol significativo para la sobrevivencia celular. Sin embargo se debe señalar que el suero fetal bovino (FBS) empleado para los cultivos sin EPO contiene EPO, que impide determinar si las células de los pacientes con un retardo en la apoptosis son totalmente independientes a EPO. (10)

En la médula es probable que la población de células con retardo en la apoptosis esté compartiendo residencia con las células normales. Entonces se esperaba observar una diferencia entre los cultivos con y sin EPO, debido a la responsividad de las células normales a la EPO; el no observar esta diferencia probablemente sea debido a que la población de células de la línea roja hiper-responsivas a EPO sean predominantes en la población medular.

Durante los diferentes tiempos de cultivo el porcentaje de células apoptóticas se mantuvo constante. Entonces el tiempo de activación y sobrevivencia de las células hiper-responsivas o independientes a la EPO se prolonga más allá de los 14 días; in vivo esto determinaría un aumento de eritrocitos de modo exponencial que sería incompatible con la vida; entonces, es probable que in vivo se presenten mecanismos que determinen la apoptosis por vías diferentes a la EPO (11). El DNA degradado de los pacientes

también presentó un retardo del patrón de apoptosis con relación a los controles (DNA degradado  $p = 0,014$ ). La presencia del DNA de alto peso molecular a los 7 y 14 días en los controles, que por morfología presentaban solamente células apoptóticas, se explica con la presencia de núcleos enteros, enucleados por los eritroblastos ortocromáticos.

De acuerdo al modelo de heterogeneidad de respuesta de Koury<sup>(5)</sup>, cada célula responde de forma diferente a la EPO para evitar la apoptosis, entonces las células con potencial para causar la enfermedad podrían requerir menos EPO para sobrevivir. Por tanto estas células sobrevivirán en mayor número que el resto de las precursoras eritroides, aumentándose también el tiempo en el cual pueden generar nuevas células. Entonces las progenitoras eritroides, con un patrón de apoptosis alterado predominan en la médula.

Se observó en ambos pacientes eritroblastos en mitosis, a pesar que las condiciones del medio líquido de cultivo no permiten la proliferación celular. Por otro lado la presencia de granulaciones hemoglobínicas y basófilas en estas células indican un avanzado nivel de diferenciación celular donde la mitosis es poco frecuente.

El haber determinado la existencia de una relación del patrón de apoptosis con la EPA no solamente brinda una vía de investigación del origen de la enfermedad, sino que también provee de una potente metodología de ensayo "in vitro".<sup>(12)</sup>

Esta última posibilidad está apoyada en el hecho que en los pacientes se observaron algunas células de la línea eritroide en división celular, reconocidos por la granulación citoplasmática.

## CONCLUSIONES

El cultivo líquido de progenitores eritroides permite el análisis de la sobrevivencia celular, obteniéndose estadios de diferenciación desde el eritroblasto basófilo hasta el ortocromático en enucleación. Para los pacientes estudiados la morfología y el DNA degradado evidenciaron la presencia de un patrón retardado en la apoptosis, significativamente diferente del presentado en los controles, lo que evidencia que en la línea eritroide de los pacientes existe una alteración en algún regulador de la sobrevivencia celular. En los pacientes el retardo de la apoptosis no es EPO dependiente ni se incrementa con relación al tiempo, que podría ser factor etiopatogénico de la EPA.

## AGRADECIMIENTOS

El presente estudio fue posible gracias a la cooperación de la Asociación Paolo Belli de Bergamo Italia y al soporte logístico de los profesores Alessandro Rambaldi y Andrea Biondi de Italia.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. VALDERRÁBANO F : Eritropoyetina humana recombinante. 1 ed, Ed. Biblio STM. Barcelona. 1998.
2. FAURA J., RAMOS J., REYNAFARJE C., ENGLISH E., FINNE P. y FINCH C. : Effect of altitude on erythropoiesis. *Blood*. 1969; 33: 678.
3. LEON-VELARDE F., MONGE C., VIDAL A., CARCAGNO M., CRISCUOLO M. y BOZZINI C.: Serum immunoreactive Erythropoietin in high altitude natives with and without excessive Erythrocytosis. *Experimental Hematology*. 1991; 19: 257-260.
4. BINET J., MENTZ F. y MERLE-BERAL H. : Apoptosis in blood diseases. *Hematology cell therapy*. 1996; 3: 253-264.
5. KOURY M. y BONDURNAT M. : The molecular mechanism of erythropoietin action. *European journal of Biochemistry*. 1992; 210: 649-663.
6. ARIAS A. Determinación de la existencia de alteraciones genéticas relacionadas con una transformación monoclonal, patrón de apoptosis y crecimiento dependiente de eritropoyetina en mujeres postmenopausicas con Eritrocitosis Patológica de la Altura. Universidad Mayor de San Andrés. La Paz. 2000.
7. BLOBEL G., SIEFF C. y ORKIN S. : Ligand-dependent repression of the erythroid transcription factor GATA-1 by the estrogen receptor. *Molecular and cellular biology*. 1995; 6: 3147-3153.
8. CHIBA T., IKAWA Y., TODOKOROK. : GATA-1 transactivates erithropoietin receptor gene, and erythropoietin receptor -mediated signals enhance GATA-1 gene expression. *Nucleic acids research*. 1991; 14:3843-3848.
9. YU H., BAUER B., LIPKE G., PHILLIPS R. y VAN ZANT G. : Apoptosis and hematopoiesis in murine fetal liver. *Blood*. 1993. 2: 373-384.

10. GARTNER S. y KAPLAN H. Long term culture of human bone marrow cells. Proc. National Academy of Science USA. 1980 ; 8: 4756-4759.
11. FAGG B. : Is erythropoietin the only factor wich regulates late erythroid differentiation?. Nature. 1981. 289: 184.
12. HILIPOTT N. :Increased apoptosis in aplastic anemia bone marrow progenitor cells:possible pathophysiologic significance. Experimental Hematology. 1995 ; 23: 1642-1648.

**TABLA N° 1**  
**CARACTERÍSTICAS DEL GRUPO DE ESTUDIO**

Variable	Paciente 1	Paciente 2	Control 1	Control 2	Control 3	Control 4
EPA	Enfermo	Enfermo	Sano	Sano	Sano	Sano
Sexo	Femenino	Femenino	Femenino	Femenino	Femenino	Femenino
Hematocrito %	82,00	60,00	40,20	38,00	41,00	44,60
Hematobina g/dl	23,00	18,88	13,80	12,80	12,90	15,30
Edad años	50	50	43	57	70	49
Edad intervalo de confianza al 95%	50					
Edad P> [ t ]	0,6437					
Edad Significancia	No significativo					
IMC	24,42	25,39	22,31	23,93	20,78	20,32
IMC intervalo de confianza al 95%	18,74 - 31,07		19,28 - 24,34			
IMC P>[ t ]	0,0658					
IMC Significancia	No significativo					

IMC= Índice de Masa Corporal.

**TABLA N° 2**  
**"T" DE STUDENT PARA LAS VARIABLES CONTROL**

Variabl	EPA	Observaciones	Media	Error estándar	Desviación estándar	Intervalo de confianza al 95%	P> [ t ]	Significancia
Edad años	Enfermos	2	50	0	0	50	0,6437	No significativo
	Sanos	4	54,5	6,01	12,02	35,38 73,62	0,0658	
IMC	Enfermos	2	24,91	0,48	0,69	18,74 31,07		No significativo
	Sanos	4	21,81	0,80	1,59	19,28 24,34		

IMC= Índice de masa corporal.

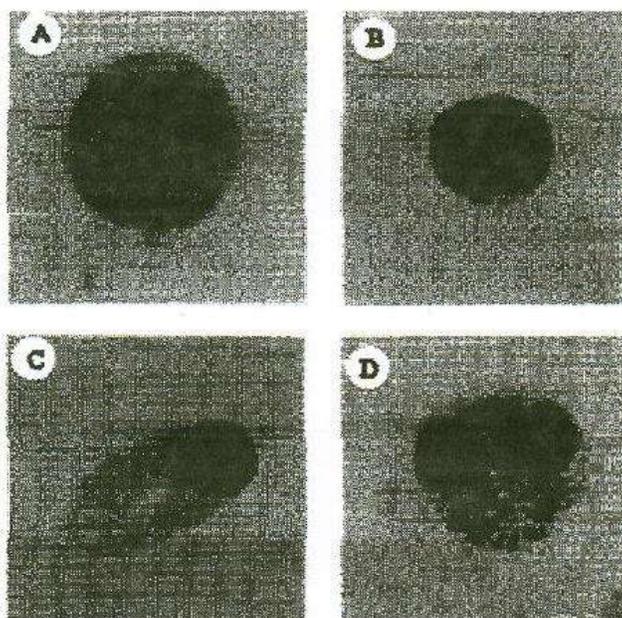


Fig. 1. Células aisladas del cultivo en medio líquido de progenitoras eritroides. A: Eritroblasto policromático; B: Eritroblasto ortocromático; C: Eritroblasto ortocromático en enucleación; D: Células en mitosis. Tinción May-Grunwald, X 1000.

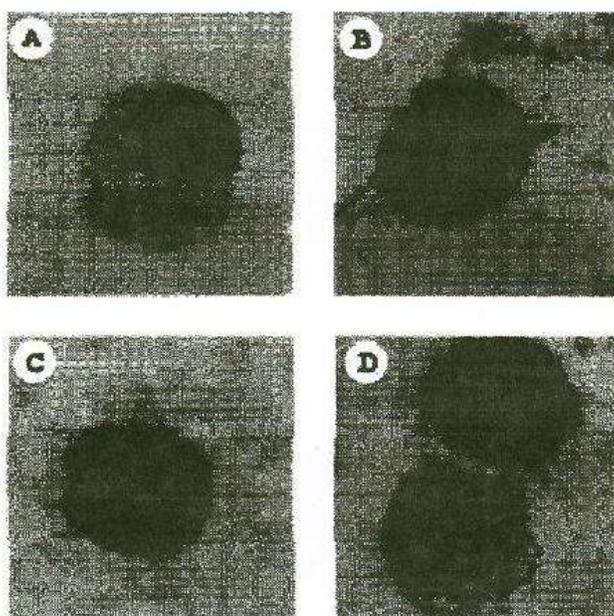


Fig. 2. Células apoptóticas aisladas del cultivo en medio líquido de progenitoras eritroides. A: Eritroblasto con inicio de desaparición de la membrana nuclear; B: Célula apoptótica en la que la cromatina ha invadido el citoplasma; C: Célula apoptótica en la que ya se han formado los cuerpos apoptóticos; D: Célula apoptótica en la que se ha iniciado la liberación de los cuerpos apoptóticos. Tinción May-Grunwald, X 1000.

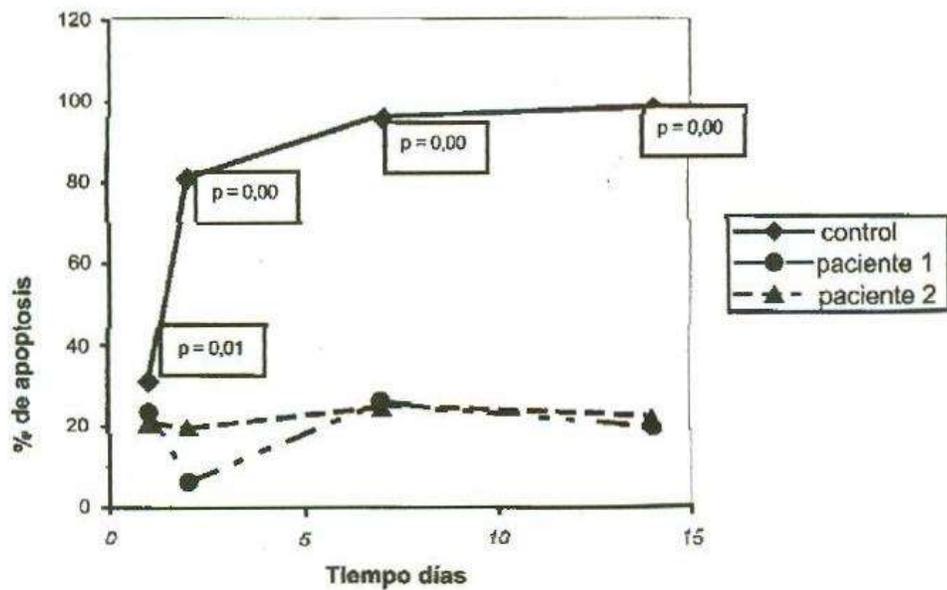


Fig. 3. Porcentaje de apoptosis de células eritropoyéticas aisladas de médula ósea de los dos pacientes y la media de los controles a diferentes tiempos de cultivo sin EPO. El p de significancia se presenta en cada punto.

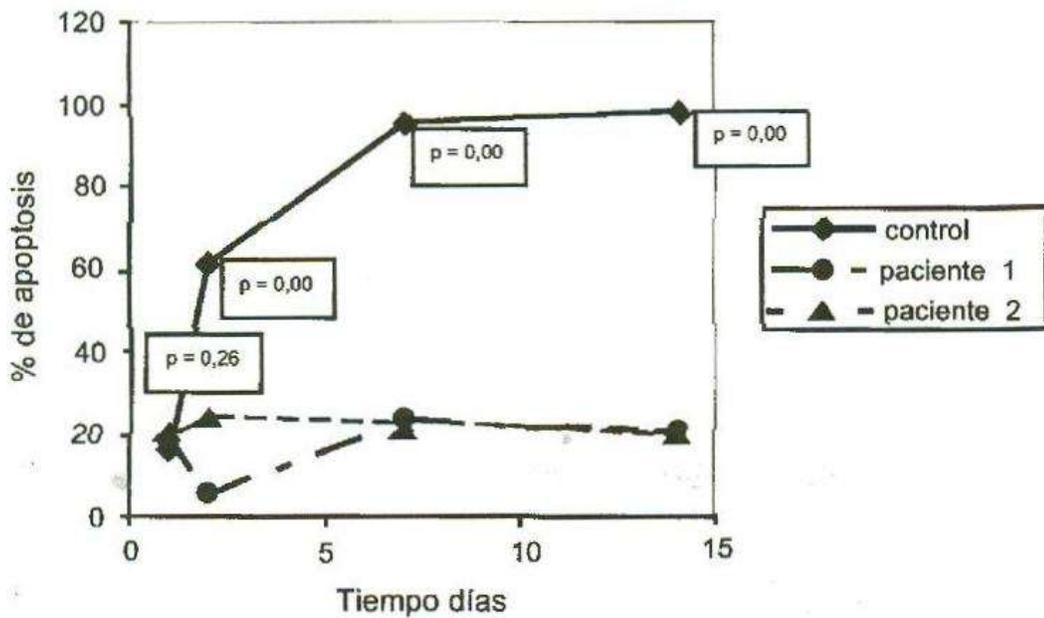


Fig. 4. Porcentaje de apoptosis de células eritropoyéticas aisladas de médula ósea de los dos pacientes y la media de los controles a diferentes tiempos de cultivo con EPO. El p de significancia se presenta en cada punto.

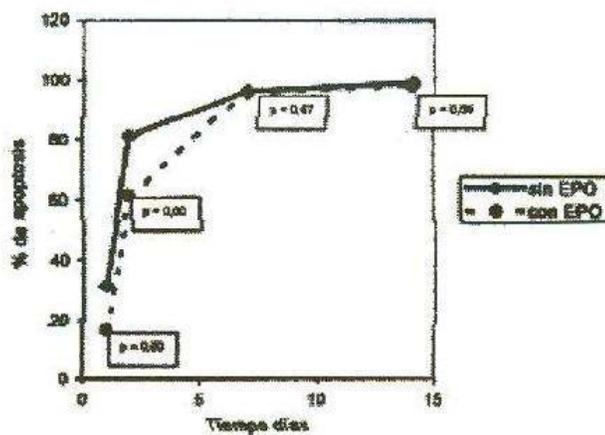


Fig. 5. Porcentaje de apoptosis de células eritropoyéticas aisladas de médula ósea de los controles a diferentes tiempos de cultivo en presencia de EPO y en ausencia de la hormona. El p de significancia se presenta en cada punto.

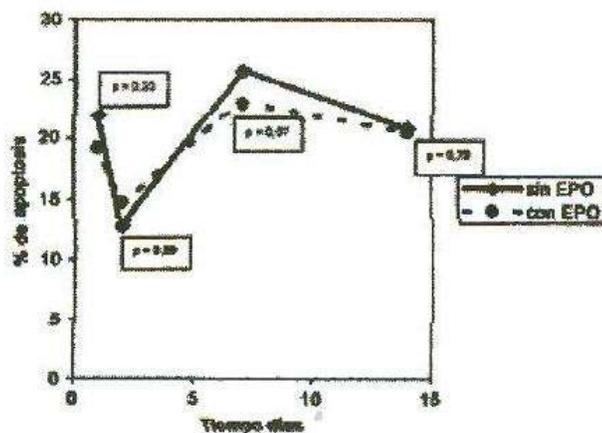


Fig. 6. Porcentaje de apoptosis de células eritropoyéticas aisladas de médula ósea de los pacientes a diferentes tiempos de cultivo en presencia de EPO y en ausencia de la hormona. El p de significancia se presenta en cada punto.

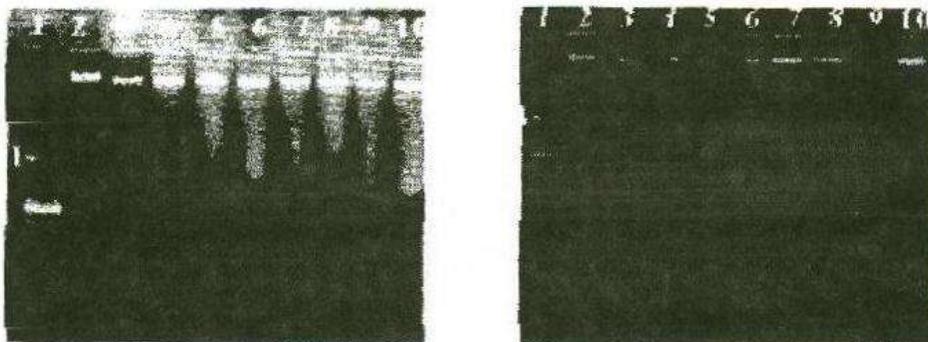


Fig. 7. Electroforesis de DNA de progenitoras eritroides cultivadas en medio líquido en presencia y ausencia de EPO. Distribución en los carriles 1: marcador *Vill* de peso molecular; 2: Control de DNA extraído a las 0 horas; 3, 4, 5 y 6 DNA extraído de los cultivos con EPO a las 24 horas, 48 horas, 7 y 14 días respectivamente; 7, 8, 9 y 10 DNA extraído de los cultivos sin EPO a las 24 horas, 48 horas, 7 y 14 días respectivamente. A: Patrón de apoptosis de los controles; B: Patrón de apoptosis del paciente 1, el patrón de apoptosis del paciente 2 es similar.  $\lambda=1114$  pb.