

FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE GRANADA

"BIOPATOLOGIA HEMORREGICA EN
LA HIPOXEMIA ARTERIAL SISTÉMICA
CRÓNICA DE LA OBSTRUCCIÓN
CRÓNICA AL FLUJO AEREO"

ALFREDO LUIS MICHELAN DONA

UNIVERSIDAD DE GRANADA

ACTA DEL GRADO DE DOCTOR EN MEDICINA

Curso de 1987 a 1988

Folio 3

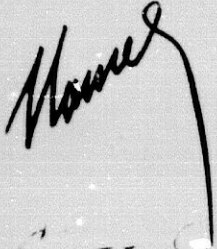
Número 5

Reunido en el día de la fecha el Tribunal nombrado para el Grado de Doctor de D. Alfredo de la
Michan Doña, el aspirante leyó un discurso sobre el siguiente
tema, que libremente había elegido: Biopatología entrocítica en la hipocemia
arterial sistémica crónica de la obstrucción crónica al flujo
aéreo

Terminada la lectura y contestadas la objeciones formuladas por los Jueces del Tribunal, este
le calificó de BPTO "CUM LAUDE".

Granada 9 de Octubre de 1988

EL PRESIDENTE.



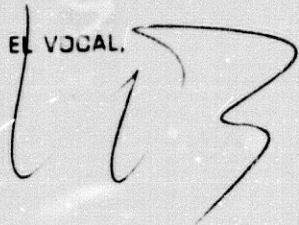
Fdo.: JOSE GÓMEZ SANCHEZ

El Secretario del Tribunal.



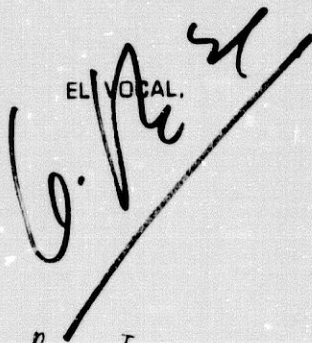
Fdo.: FEDERICO CAÑIZARES GARCIA

EL VOCAL.



Fdo.: JULIO ORTIZ VÁZQUEZ

EL VOCAL.



Fdo.: JOSE RICO IRLES

EL VOCAL.



Fdo.: P. VICENTE CRESPO FERRER

FIRMA DEL GRADUANDO.

Alfredo de la Michan Doña

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR (Prof. Antonio CAMPOS MUÑOZ)
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE GRANADA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA INTERNA (Prof. Julio ORTIZ VAZQUEZ)
HOSPITAL LA PAZ
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID

" BIOPATOLOGIA ERITROCITICA EN LA HIPOXEMIA ARTERIAL SISTEMICA CRONICA
DE LA OBSTRUCCION CRONICA AL FLUJO AEREO "

Tesis que para optar al grado de Doctor presenta el
Licenciado D. Alfredo Luis MICHAN DOÑA.

Dirigida por el Profesor Dr. D. Antonio CAMPOS MUÑOZ.

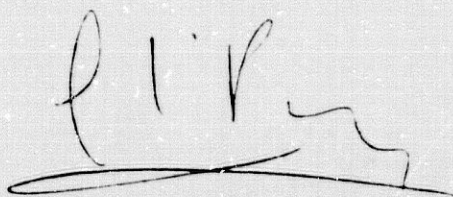
DON ANTONIO CAMPOS MUÑOZ CATEDRÁTICO DE HISTOLOGIA Y
EMBRIOLOGIA GENERAL DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA
UNIVERSIDAD DE GRANADA.

CERTIFICA: Que D. Alfredo Luis MICHAN DOÑA, Licenciado
en Medicina y Cirugía, ha realizado bajo mi
dirección los trabajos de investigación correspon-
dientes a su Tesis Doctoral " BIOPATOLOGIA ERITRO-
CITICA EN LA HIPOXEMIA ARTERIAL SISTEMICA CRONICA
DE LA OBSTRUCCION CRONICA AL FLUJO AEREO " y que
este trabajo reúne las condiciones necesarias para
su presentación y defensa. Y que para que así conste
expido la presente certificación en Granada a
15 de Junio de 1.987.

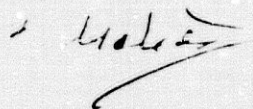
Campos



Los estudios clínicos y bioquímicos de este trabajo
han sido realizados en los Servicios de Medicina Interna y
Bioquímica Clínica del Hospital "La Paz" del INSALUD,
Universidad Autónoma, Madrid.



Fdo. Dr. Juan García Puig.
Médico Adjunto del Servicio de Medicina Interna.



Fdo. Dra. Felicitas Mateos Antón.
Jefe Clínico del Servicio de Bioquímica Clínica.



Fdo. Prof. Julio Ortiz Vázquez.
Jefe del Servicio de Medicina Interna.
Catedrático de Patología y Clínicas Médicas.
Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid.

Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Medicina
Dpto. de Medicina en «La Paz»
(Prof. J. Ortiz Vázquez)

DEDICATORIA

A Ramón y Carmen, mis padres
y a Adela y Alfredo, mi futuro.

AGRADECIMIENTOS

Al Profesor D. Julio Ortiz Vazquez, que ha posibilitado, en nuestro hospital con marcada sobrecarga asistencial, el desarrollo del presente trabajo y, sobre todo, por su magisterio cotidiano.

Al Profesor D. Antonio Campos Muñoz, básicamente un universitario, por que sin su aliento, empeño y tolerancia esta tesis no se hubiera llevado a cabo.

Al Dr. D. Juan García Puig por demostrarme que la investigación clínica con rigor científico es posible en este país y por imbuirme parte de su inagotable capacidad de trabajo y esperanza.

Al Profesor D. José Rico Irles, que me inició en la Patología Médica y me orientó en los caminos a seguir.

A los Profesores D. Pascual Vicente Crespo Ferrer, D. Francisco José Macías López, D. José Manuel García López y D. Eduardo Fernández Segura por su supervisión técnica en la M.E.B. y su amistad.

A las Dras. Teresa Ramos Hernández y Felicitas Mateos Anton por su inestimable colaboración en el Laboratorio y por la ayuda y afecto que en todo momento me han dispensado.

A los Dres. Rosario Madera Jarabo y Salvador Arribas Valiente por su dirección en las tareas correspondientes al estudio estadístico.

A la D.U.E. Natividad Santos Burgos por su inapreciable labor en el tratamiento de las muestras.

A la Dda. Dña María Eugenia Lora Pedregal por el cariño con que me ha brindado el imprescindible apoyo logístico.

A todos mis compañeros de la Facultad de Medicina de Granada y del Hospital La Paz que han contribuido a la realización de esta tesis muy especialmente a los del Servicio de Respiratorio por la remisión de los enfermos, GRACIAS.

A D. Miguel Toba, Dña Concepción de la Cuesta y Dña Maribel
Arroquia, mis maestros, por serlo.

ABREVIATURAS

A: Acantocito.

ADP: Adenosin difosfato.

AMP: Adenosin monofosfato.

ATP: Adenosin trifosfato.

AUo: Acido Urico en orina.

C: Codocito.

° C: Grado centígrado.

CCr: Aclaramiento de creatinina.

CECA: Comunidad Europea del Carbón y del Acero.

C.H.C.M.: Concentración Hemoglobínica Corpuscular Media.

cols.: colaboradores.

C.P.T.: Capacidad pulmonar total.

CUr/CCr: Excreción fraccionada de ácido úrico.

D: Discocito.

Da: Dacriocito.

Dr: Drepanocito.

El: Eliptocito.

Eq: Equinocito.

Es: Esferocito

Esq: Esquizocito.

Est: Esferoestomatocito.

Et: Estomatocito.

FEF 50: Flujo mesoespiratorio (50%)

gr: gramo.

gr/dl: gramo por decilitro.
Hb: Hemoglobina.
H.C.M.: Hemoglobina Corpuscular Media.
Hcto: Hematocrito.
H.P.L.C.: Cromatografía Líquida de Alta Resolución.
Htíes: Hematíes.
Hxo: Hipoxantina en orina.
Hxp: Hipoxantina plasmática.
IMP: Inosina monofosfato.
Inop: Inosina plasmática.
K: Keratocito.
Ki: Kinizocito.
Kv: Kilovoltio.
L: Leptocito.
M: Molar.
m²: metro cuadrado.
M.E.B.: Microscopía Electrónica de Barrido.
mEq/l: miliequivalente por litro.
ml: mililitro.
ml/min: mililitro por minuto.
mM: micromolar.
mm Hg: milimetro de mercurio.
mm³: milimetro cúbico.
mmol: milimolar.

mmol/gr Cr: milimol por gramo de creatinina.

nº: número.

N.S.: No significativo.

O₂: oxígeno.

O.C.F.A.: Obstrucción Crónica al Flujo Aéreo.

paO₂ ó pO₂: presión arterial de oxígeno.

paCO₂ ó pCO₂: presión arterial de dióxido de carbono.

p.e.: por ejemplo.

pg: picogramo.

PTo: Purinas totales en orina.

PUr: uricemia.

R: Reticulocito.

r.p.m.: revoluciones por minuto.

S.C.: Superficie corporal.

T: Torocito.

V.C.M.: Volumen corpuscular medio.

VEMs: Volumen espiratorio máximo por segundo.

V.R.: Volumen residual.

\bar{x} : media.

Xo: xantina en orina.

xp: xantina plasmática.

µl: microlitro.

µM: micromolar.

µm, µm², µm³: micras, micras cuadradas, micras cúbicas.

INDICE

INDICE:

INTRODUCCION	1
MATERIAL Y METODOS	14
RESULTADOS	37
DISCUSION	125
CONCLUSIONES	145
BIBLIOGRAFIA	150

INTRODUCCION

La hipoxemia arterial sistémica crónica constituye la evolución natural básica de los procesos que cursan con obstrucción crónica al flujo aéreo (OCFA) condicionando la determinación pronóstica de los mismos (MITCHELL y cols -142-, BURROWS y EARLE - 39-, DAVIS y McCLEMENT -48-, KAWAKAWI y cols -110-).

En efecto, independientemente de la sintomatología clínica generada por la enfermedad causal, la hipoxia se manifiesta evolutivamente en el curso de su desarrollo crónico por alteraciones de índole neurológica (PLUM y cols -156-), cardiovasculares (FISHMAN -68 -), de la función renal (KILBURN y DOWELL -117-, FARBER y cols -64 -) y esencialmente por alteraciones hematológicas (BALCERZAK y BROMBERG - 8-, HARRISON y STOKES -98-).

Las alteraciones hematológicas son precisamente las que permiten, debido fundamentalmente a su accesibilidad diagnóstica, una valoración más exacta en la evaluación del proceso hipóxico. En este

sentido se han definido indicadores que atañen a parámetros hematimétricos tales como la hemoglobina, el hematocrito, ... (MIALE -141-), marcadores gasométricos tales como la presión arterial de oxígeno, la presión venosa de oxígeno,... (ROMERO CANDEIRA y cols -165 -, KASNITZ y cols -109-) y a indicadores metabólicos tales como los niveles de ATP, ADP, AMP y metabolitos purínicos (FOX y cols -71 -, SAUGSTAD - 175-, SAUGSTAD y AASEN -117-, HARMSSEN y cols -97-, CARRANZA -40-) que se han puesto especialmente de relieve en la hipoxia aguda.

Por otra parte y en relación básicamente con alteraciones hemoglobínicas se han establecido indicadores morfológicos cuya significación biopatológica no ha sido aplicada en la hipoxemia arterial sistémica crónica de la OCFA (BUNYARATVEJ y cols -38-, CHENG y cols -41-, DARDANO y KINZEY -47-, GARCIA y cols -81-).

Los parámetros gasométricos constituyen los indicadores más utilizados en la clínica en relación con el establecimiento de los distintos protocolos terapéuticos (FULMER y SNIDER - 79 -, SANCHEZ AGUDO -171-, ANTHONISEN -6-). Sin embargo es importante precisar que la presión arterial de oxígeno es tan sólo un índice de intercambio gaseoso a nivel pulmonar y por tanto no es un parámetro que informe directamente de la oxigenación tisular.

En relación con los indicadores metabólicos arriba reseñados es importante constatar que existen diversas situaciones patológicas y experimentales en las que se ha evidenciado que el aumento de la degradación de ATP acelera la vía catabólica de los nucleótidos purínicos (FOX -72-, -74-). La administración endovenosa rápida de fructosa

promueve, en efecto, la degradación de ATP (fosforilización a fructosa-1-fosfato y fructosa 1,6-difosfato) con un incremento de AMP e IMP y elevación de los niveles de inosina, hipoxantina, xantina y ácido úrico (Figura 1). La hiperuricemia que acompaña al déficit de glucosa-6-fosfatasa puede derivar de un mecanismo similar al inducido por la fructosa (GREENE y cols - 90-, ROE y KOGUT - 164-). Durante el ejercicio físico y en pacientes en estado crítico, por otra parte, se ha comprobado un aumento plasmático de los niveles de oxipurinas concomitante a un descenso de ATP intracelular e incremento de ADP y AMP (HARKNESS y cols - 95-, PATTERSON y cols -153-, GRUM y cols - 91 -). Recientemente se ha demostrado que la hiperuricemia inducida por el alcohol se debe a la formación de acetato y su metabolismo con consumo de ATP (FALLER y FOX - 63-, PUIG y FOX -161-). Estas observaciones permiten afirmar que la degradación de ATP condiciona un aumento del pool de nucleótidos y pone en marcha la vía degradativa de los nucleótidos purínicos (Figura 2).

La hipoxia puede producir un descenso de los niveles de ATP por disminución de su síntesis al inhibir la fosforilización oxidativa y por mayor consumo de ATP en otras reacciones vitales (COHEN - 45-). Ambos mecanismos conducen a la degradación en cascada de los nucleótidos purínicos y a la aparición de productos intermediarios del catabolismo purínico que se comportan como marcadores de la degradación tisular de ATP. Diversos modelos clínicos y experimentales han comprobado la existencia de una relación entre hipoxia y metabolismo de los nucleótidos purínicos. Así por ejemplo durante el ejercicio isquémico

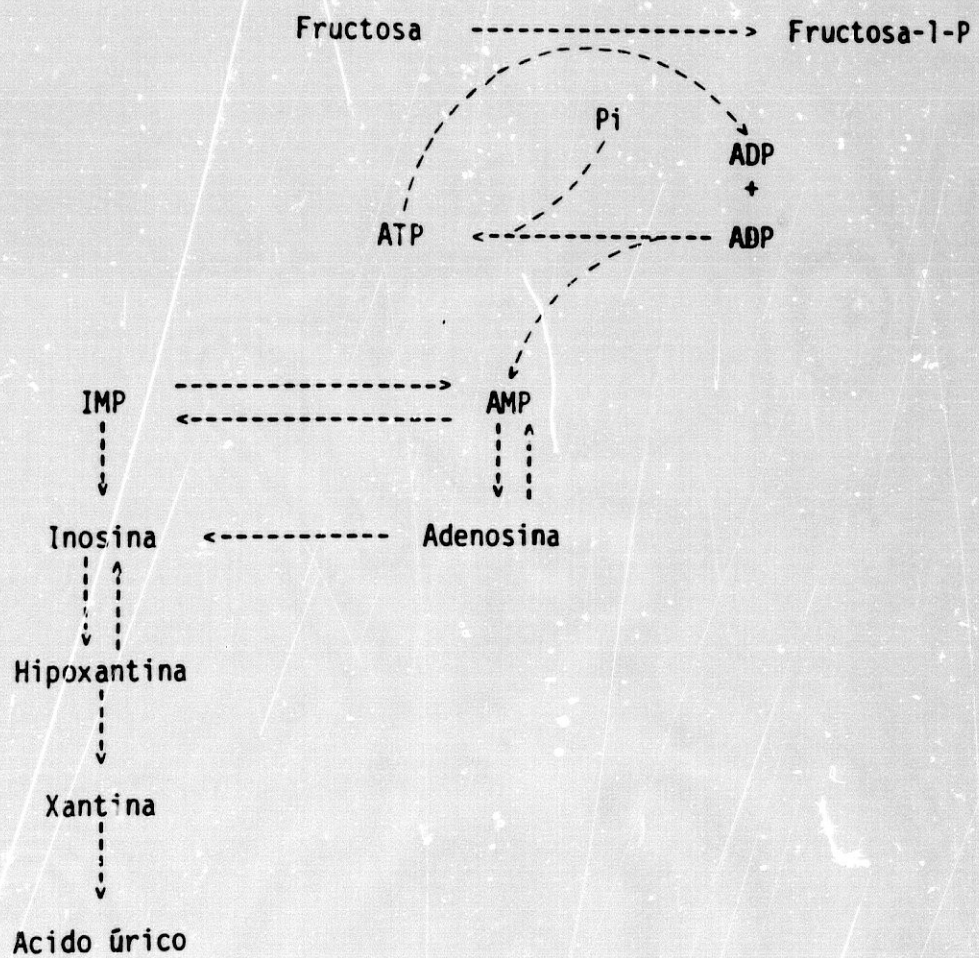


FIGURA 1.- DEGRADACION DE NUCLEOTIDOS PURINICOS INDUCIDA POR LA FRUCTOSA

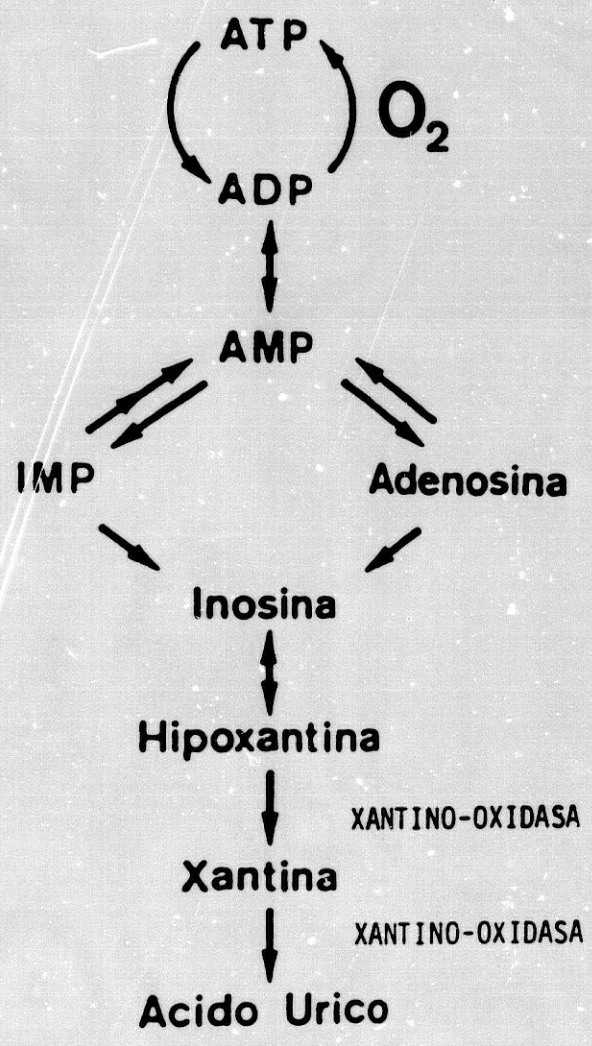
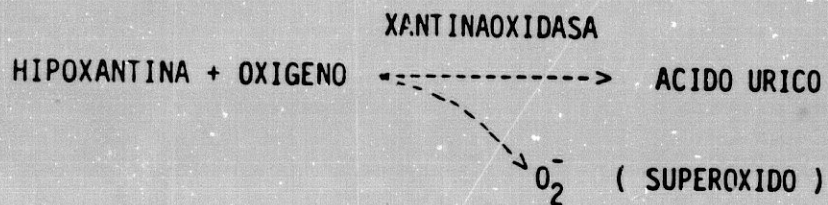


FIGURA 2.- ESQUEMA DE LA INFLUENCIA DE LA HIPOXEMIA EN LA DEGRADACION DE LOS NUCLEOTIDOS DE ADENINA.

se produce un incremento de los niveles plasmáticos de hipoxantina y de inosina (SUTTON y cols - 191-). Este aumento es mucho más marcado cuando, además de hipoxia, existe una incapacidad para utilizar substratos energéticos como en el déficit de miofosforilasa y de carnitina-palmitil-transferasa (BROOKE y cols - 35-). En estos defectos enzimáticos existe una limitación de la capacidad mitocondrial para resintetizar el ATP consumido durante el ejercicio.

Asimismo se ha comunicado por diversos autores (GHOSH y cols - 84-, DOSMAN y cols - 56 -, WIENER - 206 -) una mayor incidencia de hiperuricemia en el curso del infarto de miocardio independientemente de otros factores que pueden causar incremento de la concentración sérica de uratos - disminución de la función renal, administración de diuréticos,... - (WOOLLISCROFT y cols -211-). En este sentido FOX y cols -70- y REMME y cols -163- comprobaron un aumento de la liberación de adenosina, inosina e hipoxantina en enfermos con cardiopatía isquémica inducida por sobreestimulación auricular. En este contexto se ha asociado la hipoxia perinatal con alteraciones del metabolismo de los nucleótidos purínicos (HARKNESS y cols - 96 -, BRATTEBY y SWANSTROM - 31 -). Así se han descrito la elevación de las concentraciones de hipoxantina y xantina en el líquido amniótico (HARKNESS y cols - 94 -) en la orina (MANZKEH y cols - 133 -), en el líquido cefalorraquídeo (HARKNESS - 92 -) y en el plasma de neonatos afectos de sufrimiento fetal (SAUGSTAD y cols - 180) y la disminución de los niveles intra-eritrocitarios de nucleótidos purínicos (CARRANZA - 40-) en situación similar.

El sistema hipoxantina-xantina oxidasa previamente descrito y fundamental en la interpretación biopatológica de los procesos hipóxicos resulta además ser según SAUGSTAD - 176 - y SAUGSTAD y cols -178, -179, la fuente más importante en la generación de radicales libres por vía enzimática (FRIDOVICH - 77-, McCORD -138):



Dichos radicales parecen constituir en el momento presente un factor crucial en diferentes áreas de la Medicina tales como la irradiación por Rayos X (PETKAU y cols - 154, McLENNAN y cols -139-), la etiología del cáncer (DIONSI y cols - 53 -, TOTTER - 193 -), la toxicidad por oxígeno (STEVENS y AUTOR -189-, WEISFELDT - 203 -), el envejecimiento (PRYOR -160-), las enfermedades articulares degenerativas e inflamatorias (McCORD -137, DEL MAESTRO y cols - 51 -) y la pancreatitis aguda (SANFEY y cols -173-).

El estudio en consecuencia del metabolismo de las purinas y su relación con la hipoxia constituye por todo ello uno de los capítulos de investigación más sugestivo de este campo.

Además de las determinaciones de purinas en plasma y en orina y de la utilización de adenina marcada (FOX -72-), dos son las vías básicas de investigación bioquímica en la ruta metabólica antes

descrita: la sobrecarga de substrato, como ocurre por ejemplo con la infusión rápida de fructosa ya citada (FOX y KELLEY - 75 -), o el bloqueo enzimático a distintos niveles de la vía. En este sentido, el Alopurinol - 4-hidroxi-(3,4d) pirazolopirimidina- inhibidor de la xantino-oxidasa bloquea las fases finales del metabolismo de las purinas (Figura 2) (RUNDLES y cols - 169 -, KRAKOFF - 120 -, WATTS y cols - 200- y RUNDLES - 168-).

Si los efectos de sobrecarga de substrato en la hipoxemia arterial sistémica crónica de los pacientes que cursan con obstrucción crónica al flujo aéreo han sido escasamente investigados (GOMEZ - 86-), la influencia del alopurinol en su papel inhibidor en la vía metabólica de las purinas así como su posible incidencia en la génesis de los radicales libres puesta de relieve en diferentes procesos (GRANGER y cols - 87 -, SANFEY y cols - 174-) no ha sido, por el contrario, objeto de especial atención en los pacientes con OCFA.

La aplicación de indicadores morfológicos y fundamentalmente eritrocíticos a la interpretación biopatológica de la hipoxemia arterial sistémica crónica no ha constituido, como hemos reseñado, un capítulo de investigación preferente en este area.

La biología celular eritrocítica sin embargo se configura como el eje básico de interrelación estructura/función ante las distintas situaciones hematológicas y en consecuencia, en nuestro caso, ante la hipoxemia arterial sistémica crónica de los pacientes con OCFA.

En efecto en este contexto destacan los estudios acerca de

la deformabilidad y/o rigidez estructural de estos elementos en relación con su comportamiento reológico en diferentes circunstancias (STUART 190), los trabajos de WILLIAMSON y cols -209- en la diabetes mellita, de VIVES CORRONS y cols - 197- en la esferocitosis hereditaria, de IRUONG y cols - 194 - en la acción de diversos agentes reductores sobre la morfología eritrocitaria, de BAKER y ROGERS - 7 - y LIEBER y cols - 126- en el efecto de diferentes drogas sobre los mismos, de WILLIAMSON y cols-210- en la influencia de la temperatura, de BESSIS y HRECHER - 21 - en la sangre conservada al igual que LA CELLE - 141 -, CHIEN y cols - 42- en relación con la viscosidad del medio, VAYA y cols - 196 - en las anemias microcíticas e hipocrómicas y NORTON y HAND - 149- en los fumadores.

La citología de los elementos eritrocíticos en sangre circulante en circunstancias normales y patológicas se ha desarrollado notablemente con la aparición de métodos y técnicas microscópicas que han hecho posible un importante avance descriptivo y, lo que es sin duda más importante, una auténtica valoración citofisiológica de la morfología celular.

En primer lugar la aplicación en las cuatro últimas décadas de la Microscopía Electrónica de Transmisión ha posibilitado en el momento presente un conocimiento más exacto de la estructura interna de dichos elementos (POLICARD y BESSIS - 157 -, ACKERMAN y cols - 1 -, GRASSO y cols - 88 -, BESSIS y BRETON-GORIUS - 21 -, BESSIS y JENSEN - 22 -, BRETON-GORIUS y GUICHARD - 33 -, LEWIS y VERWILGHEN - 125 -,

BRETON-GORIOUS y cols - 34 -, BESSIS y cols - 26 -, NAGEL y BRILLAT - 146 -, KERHOVEN y cols - 115-, ROZMAN y WOESSNER -166-, -167 - y CONDE y cols - 46-).

En segundo lugar el desarrollo a partir de las primitivas ideas de KNOLL -119- y VON ARDENE -199- de la Microscopía Electrónica de Barrido, llevado a cabo en la década de los sesenta por el Profesor Oatley -150-, -151-, ha supuesto un nuevo impulso en la configuración tridimensional definitiva de los distintos elementos sanguíneos y muy concretamente de las células eritrocíticas. En este sentido deben destacarse los trabajos iniciales de SALSBURY y CLARKE - 170 -, los posteriores de BESSIS -16 -, -17 -, -18 -, BARNHART y cols - 9 -, -10 -, - 12-, KAYDEN y BESSIS -111-, WHITE -205 -, HATTORI - 101 -, LEBLOND y SHOUCRI -123-, LE CHARPENTIER y cols -124 -, realizados en condiciones normales y los llevados a cabo en situaciones patológicas: anemias SALSBURY y CLARKE -170-, NATHAN y cols -147-, FANSWORTH y cols - 65 -, BUNYARATVEJ y cols - 38-, BESSIS y MANDON - 24 -, BESSIS y BOISFLEURY - 19-, LEBLOND y cols -122-, FEO y cols - 67 -, BERGA y cols - 15 -, GARCIA y cols - 81-, CONDE y cols - 46-, MACIAS -130-; distrofias musculares GARCEAU y cols - 83 -, cirrosis alcohólica SMITH y cols -187 -; carcinogénesis experimental KASHULINA y TERESCHENKO - 108 -; tumores colorrectales DJALDETTI y cols - 54-, y en otras circunstancias patológicas y experimentales BULL y KUHN - 37 -, BRECHER y BESSIS - 32 -, BESSIS y LESSIN - 23-, WEED y BESSIS -202-, DYLLA y ABRAMS - 57-, SOLIGO y cols -188-. Asimismo la Microscopía Electrónica de Barrido ha permitido indagar acerca de la relación de la morfología eritrocítica y los

grupos sanguíneos (LONGSTER y TOVEY -127-, SYMMANS y cols -192-, MACIAS y cols -131-).

Si como hemos descrito más arriba, independientemente de los indicadores gasométricos, existe una marcada alteración del sistema energético y del metabolismo purínico en la hipoxia y si, además, parece evidente que dichos cambios pueden generar alteraciones morfoestructurales en el sistema eritrocitario, una investigación conjunta bioquímica y morfológica en dicho nivel eritrocítico se configura como la vía más idónea para evaluar la biopatología de cualquier proceso hipóxico.

La indagación morfoestructural con Microscopía Electrónica de Barrido y bioquímica con Cromatografía Líquida de Alta Resolución (SCHWEINSBERG y LOO -182-, ZAKARIA y BROWN -213-, BOULIEU y cols -28-) de eritrocitos procedentes de pacientes con hipoxemia arterial sistémica crónica por obstrucción crónica al flujo aéreo en circunstancias variables de índole terapéutica - oxigenoterapia, alopurinol, ...- constituye el objetivo básico de la presente tesis doctoral.

Para ello en un primer apartado expondremos el material y los métodos utilizados indicando específicamente las distintas pautas terapéuticas y haciendo especial énfasis en la preparación de las muestras.

En un segundo capítulo describiremos nuestros resultados en los distintos grupos y situaciones que constituyen nuestro objeto de

estudio. En tercer lugar, por último, discutiremos nuestros resultados y elaboraremos las conclusiones.

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL:

El material utilizado para llevar a cabo el estudio bioquímico y microscópico consta de 21 especímenes procedentes de siete pacientes de edades comprendidas entre los 49 y los 69 años con obstrucción crónica al flujo aéreo diagnosticada mediante pruebas de función respiratoria según las pautas de la CECA (- 60 -, - 61 -) (Tablas I y II).

Dichos pacientes tratados con oxigenoterapia domiciliaria por hipoxemia de acuerdo con los criterios establecidos (SANCHEZ AGUDO - 171 -, ANTHONISEN - 6 -) fueron sometidos al protocolo que posteriormente describiremos aprobado por el Comité de Investigación del Hospital La Paz y la Comisión de Investigación del Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de Granada. El estudio se realizó

TABLA.- I

CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS PACIENTES

<u>Nº Caso</u>	<u>Nº Historia</u>	<u>Siglas</u>	<u>Edad (años)</u>	<u>S.C. (m²)</u>
1	269.183	A.J.R.	69	1.80
2	278.289	J.F.C.	51	1.67
3	278.443	C.D.L.	66	1.77
4	182.574	J.C.M.	61	1.98
5	272.616	A.B.F.	48	1.86
6	221.365	M.H.A.	57	1.67
7	204.373	P.L.M.	52	1.86

TABLA.- II

 RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE FUNCION RESPIRATORIA

CASO N°	<u>VEMS</u>	<u>VR</u>	<u>CPT</u>	<u>FEF 50</u>	<u>VR/CPT</u>	<u>TIFFENAU</u>
	% del Teorico				%	
1	35	86	61	19	54	58
2	25	281	129	7	71	37
3	52	176	135	20	53	43
4	38	235	125	11	64	43
5	59	169	97	61	54	75
6	23	300	134	8	78	41
7	50	143	114	16	46	45
NORMAL	> 80	80-120	80-120	> 65	30-40	70-80

de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki.

En todos los pacientes se llevó a cabo un estudio clínico previo para descartar insuficiencia renal y cardíaca, y la existencia de un proceso infeccioso intercurrente en el mes previo a su ingreso. A los pacientes, que durante todo el proceso continuaron el tratamiento farmacológico con preparados teofilínicos en idéntica dosis, se les administró una dieta isocalórica con un contenido de 50-60 mEq de sodio y menos de 75 mgr/100 gr de purinas (KELLELY -113-). La medición de la excreción renal de sodio y el peso corporal sirvieron para evaluar el seguimiento de la dieta.

El diseño del protocolo fue longitudinal sometiendo a todos los pacientes a tres situaciones:

1.- SITUACION SIN OXIGENO (una semana).

2.- SITUACION CON OXIGENO (una semana).

(gafas nasales/ Ventimask 24%, 3 lpm).

3.- SITUACION CON ALOPURINOL (una semana).

(Dosis 300 mgr/día).

Como consecuencia de ello se conforman tres grupos de muestras - 21 especímenes extraídos tras un estado de reposo físico - sobre las que se llevaron a cabo los siguientes estudios:

- GASOMETRIA: pH, PaO₂, paCO₂, CO₃H⁻.

- HEMATIMETRIA: Hb, Hcto, Htíes, VCM, HCM, CHCM.

- METABOLITOS PURINICOS: Inosina plasmática; hipoxantina, xantina y ácido úrico en sangre y en orina de 24 horas.

- NUCLEOTIDOS INTRAERITROCITARIOS: ATP, ADP, AMP e IMP.
- MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO: A. MORFOLOGIA.
B. MORFOMETRIA.

El material presentado es aquel que cumple todos los requisitos del protocolo. Dichos requisitos exigen tres determinaciones: gasométrica, hematimétrica, de metabolitos purínicos, de nucleótidos intraeritrocitarios y de Microscopía Electrónica de Barrido eritrocítica - en un mismo paciente con un intervalo de una semana. Han sido rechazados en consecuencia los resultados parciales que por diversos factores - intolerancia a la supresión de oxígeno, infección intercurrente, intolerancia a la dieta,... - han interrumpido el estudio en el resto de pacientes seleccionados.

En el siguiente apartado describiremos los métodos específicos de la Bioquímica y de la Microscopía Electrónica de Barrido que constituyen el objeto fundamental de la presente tesis.

MÉTODOS:

El material subdividido de acuerdo con lo expuesto en el apartado precedente fue sometido en relación con las determinaciones gasométricas y hematimétricas a las técnicas y métodos convencionales.

A continuación describiremos las técnicas bioquímicas de determinación de Inosina, Hipoxantina, Xantina y Acido Úrico así como las de determinación de ATP, ADP, AMP e IMP existentes a nivel intraeritrocítico. Posteriormente describiremos los métodos de Microscopía Electrónica de Barrido aplicados al eritrocito. En un último apartado indicaremos la metodología estadística utilizada.

1.- METODOLOGIA BIOQUIMICA PARA LA DETERMINACION DE LOS METABOLITOS PURINICOS: INOSINA, HIPOXANTINA, XANTINA Y ACIDO URICO.

De la sangre extraida se centrifugaron tres mililitros a 4° C, 3.000 rpm, durante diez minutos. En ningun caso el tiempo transcurrido entre la extracción y la centrifugación fue superior a diez minutos. Inmediatamente se separó el plasma y se congeló a -20° C hasta su procesamiento para la determinación de inosina, hipoxantina y xantina. Las muestras de orina se recogieron sin precauciones especiales durante 24 horas.

Las concentraciones de inosina, hipoxantina y xantina se determinaron mediante Cromatografía Liquida de Alta Resolución (HPLC) según la metodología descrita por RAMOS y cols - 162 -. El plasma fue ultrafiltrado mediante centrifugación con filtros de 30.000 Daltons (Centricon 30, Clear Base. Hucoa Erloss). Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: fase reversa con columnas μ Bondapak C18 (Waters Associates). La separación isocrática se obtuvo con fosfato amónico 50 mM, pH 6.0 con metanol 1% (v/v), a un flujo de 1.3 ml/min. La identificación de los compuestos se llevó a cabo mediante adición a la muestra de purino nucleosido fosforilasa y xantinaoxidasa para degradar los nucleósidos y bases púricas a ácido úrico. La figura 3 muestra los cromatogramas de los patrones, una muestra de plasma y la misma muestra tras la adición de enzimas. La linealidad para concentraciones entre 0.1 y 30 μ M de los tres compuestos osciló entre 0.98 y 1.0.

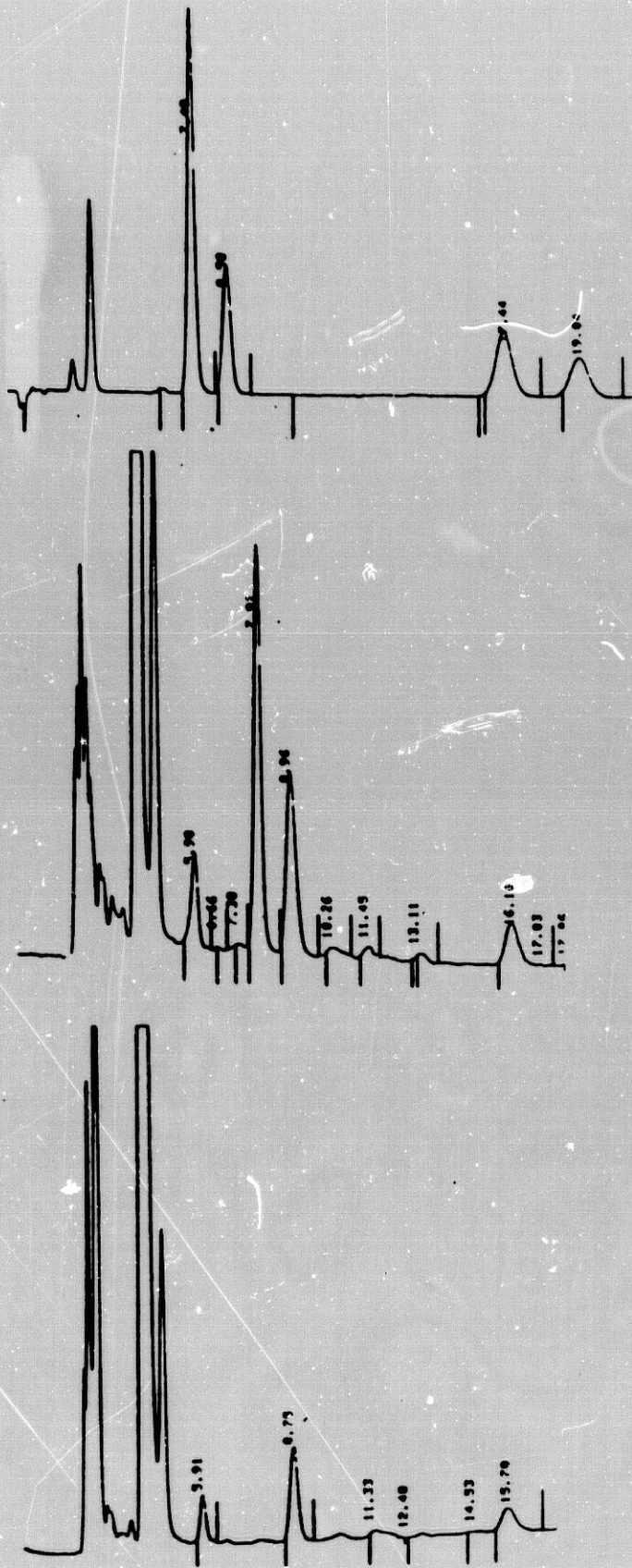


FIGURA 3.- DETERMINACION DE METABOLITOS PURINICOS: Cromatogramas de los patrones, una muestra aleatoria y la misma tras la acción de las enzimas descritas en el texto.

El ácido úrico se valoró enzimáticamente en suero y en orina de 24 horas mediante la técnica de la uricasa (KAGEYAMA -107 -). Estos datos se correlacionaron con el aclaramiento de creatinina evaluada por técnica colorimétrica (OWEN y cols -152-).

2.- METODOLOGIA BIOQUIMICA PARA LA DETERMINACION DE LOS NUCLEOTIDOS INTRAERITROCITARIOS: ATP, ADP, AMP E IMP.

Un mililitro de la sangre extraida con jeringuilla heparinizada se depositó en un tubo que contenia dos mililitros de ácido perclórico a 0.6 M y se agitó suavemente cada cinco minutos durante treinta minutos a 4° C. Posteriormente se centrifugó, tambien a 4° C, a 3.000 rpm durante diez minutos. Dos mililitros del sobrenadante se llevaron a pH 6 con KOH 0.1 M. Este procedimiento quedó estandarizado de modo que el KOH empleado fue de aproximadamente 125-250 μ l.

El ClO_4K excedente se eliminó mediante centrifugación y el sobrenadante se congeló a -20° C hasta su procesamiento para cuantificar ATP, ADP, AMP e IMP. La concentración de nucleótidos se expresa en $\text{nmol}/10^9$ células.

Las concentraciones intracelulares de ATP, ADP, AMP e IMP se determinaron por HPLC en fase reversa con columna μ Bondapak C18 (Waters Associates). La separación isocrática se obtuvo con fosfato monopotásico 0.2 M, pH 6.0 a un flujo de 1.3 ml/min (SIMMONDS y HARKNESS -186-). Los patrones de los cuatro nucleótidos se obtuvieron de Boehringer Mannheim y se prepararon para concentraciones de 25 μ M. La mezcla de los cuatro nucleótidos se realizó a partir de volúmenes iguales de modo que la solución de trabajo tuviese una concentración de 5 μ M para cada compuesto.

El volumen de muestra inyectada (patrones y muestra neutralizada) fue de $10 \mu\text{l}$. La figura 4 muestra los tiempos de retención de los patrones y muestras, respectivamente.

La concentración de nucleótidos viene dada por el área de los picos en relación con el área de los patrones. La linealidad de la técnica se estudió para los cuatro compuestos (ATP, ADP, AMP e IMP) en un rango entre 1 y $200 \mu\text{M}$, siendo r de 0.917, 0.946, 0.945 y 0.930 respectivamente (Figura 5).

Los coeficientes de variación intra e interensayo para patrones (concentraciones $25 \mu\text{M}$) y problemas (concentraciones 1.3 , 21.2, 1.3 y $3.0 \mu\text{M}$ de ATP, ADP, AMP e IMP respectivamente) se muestran en la tabla III.

La recuperación para patrones y problemas fue similar y osciló entre el 97 y el 105%.

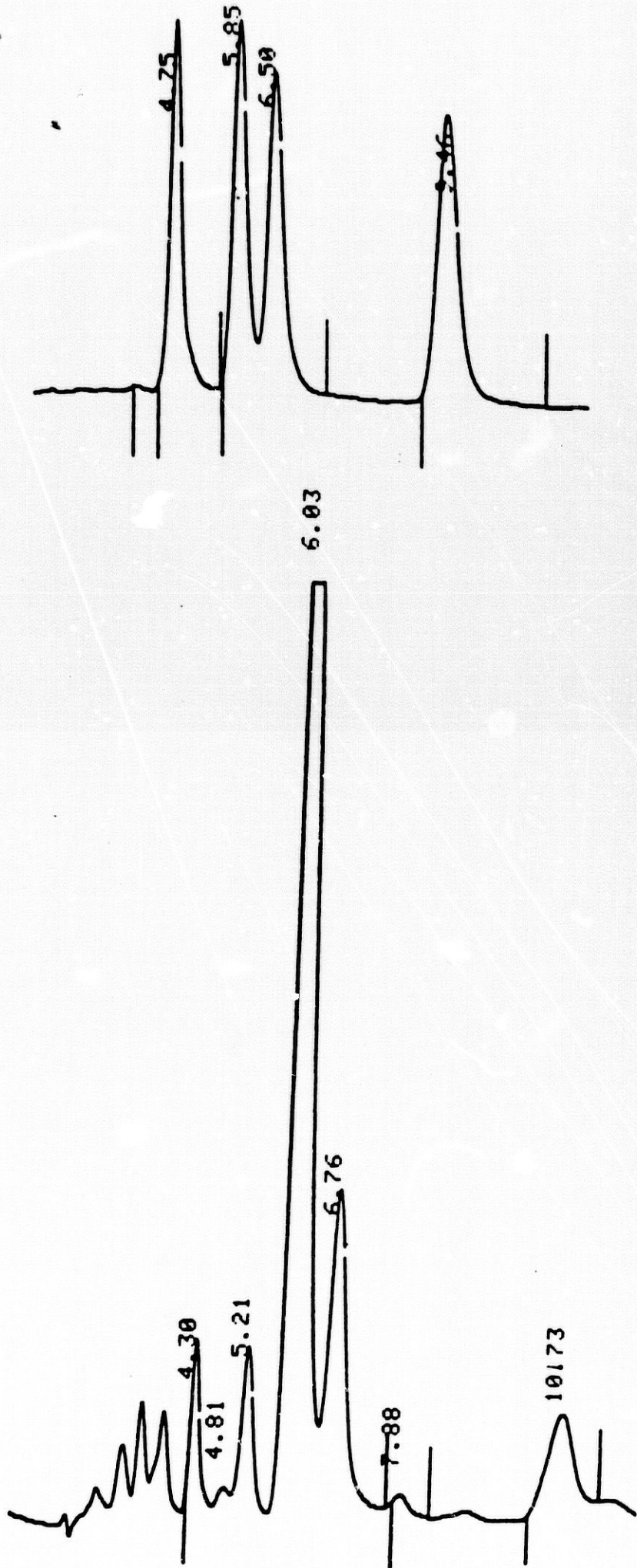


FIGURA 4.- CROMATOGRAMAS DE LOS NUCLEOTIDOS INTRAERITROCITARIOS:
patrones y muestra (ver texto).

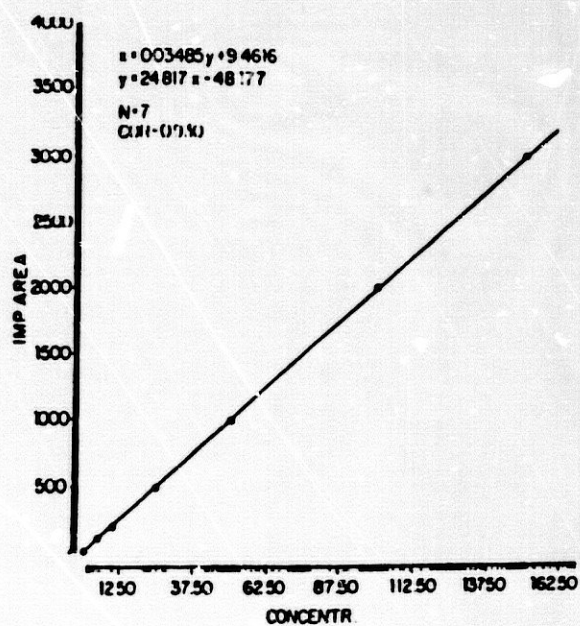
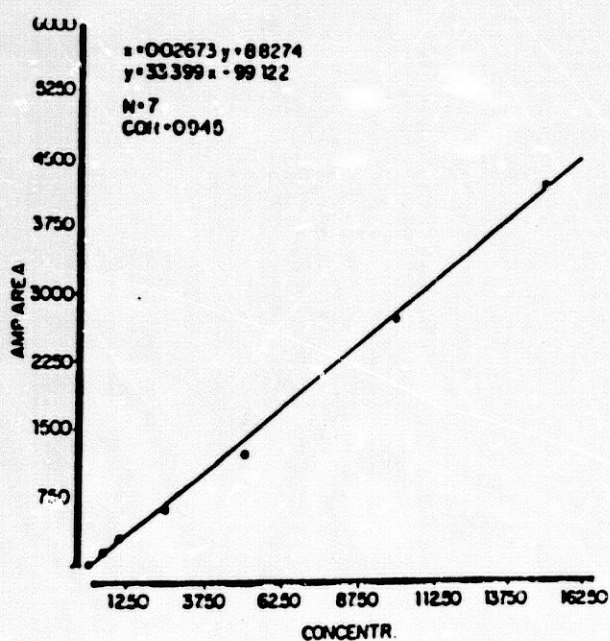
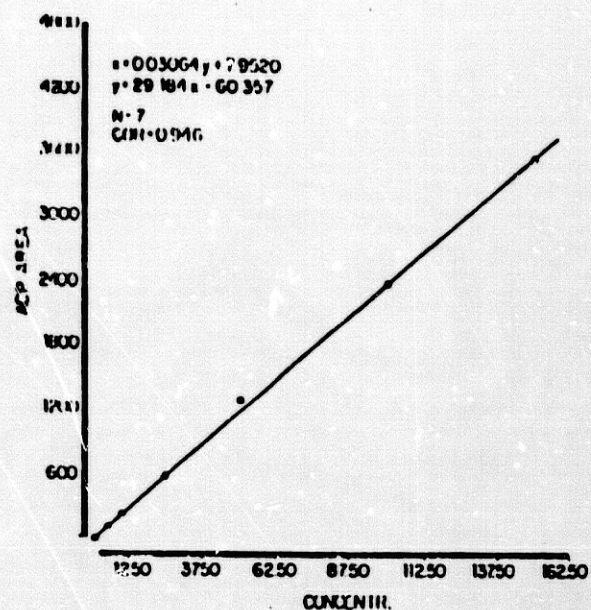
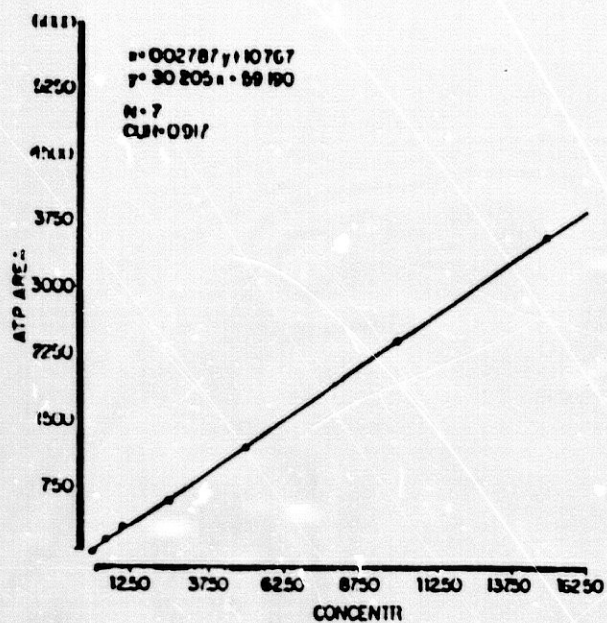


FIGURA 5.- DETERMINACION DE LOS NUCLEOTIDOS INTRAERITROCITARIOS:
Linealidad de la Técnica.

TABLA.- III

COEFICIENTES DE VARIACION (C.V.) DE PATRONES Y PROBLEMAS
DE LA DETERMINACION DE NUCLEOTIDOS PURINICOS INTRAERITROCITARIOS
MEDIANTE HPLC

	ATP	ADP	AMP	IMP
C.V. intraensayo				
Patrones	2.8	3.0	3.1	4.2
Problemas	2.0	2.9	3.5	5.0
C.V. interensayo				
Patrones	3.1	3.4	3.8	5.2
Problemas	3.0	3.5	3.8	5.4

3.- METODOLOGIA PARA LA MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO.

El método de procesamiento básico para la Microscopía Electrónica de Barrido tiene por base los trabajos de BARNHART y cols - 12 -, SALSURY y CLARKE -170- y BERGA y cols - 15-.

A. FIJACION.

Una vez extraída la sangre se procedió en primer lugar a la fijación en suspensión en una solución fijadora durante un tiempo aproximado de seis horas, siendo ésta, una solución de glutaraldehído al 1.25% amortiguada con tampón fosfato a pH de 7.4 y a una temperatura de 4° C. La sangre utilizada fue de 0.25 a 0.5 mililitros por cada 5 mililitros de glutaraldehído.

El fijador se prepara partiendo de las siguientes soluciones:

- Solución A:

- Fosfato potásico monobásico 0.1 M 13.609 gr
- Agua bidestilada csp 1.000 ml

- Solución B:

- Fosfato sódico dibásico dihidratado 17.799 gr
- Agua bidestilada csp 1.000 ml

La preparación de la solución amortiguadora se realiza de la siguiente forma:

Mezclar:

- Solución A 160 ml
- Solución B 840 ml

Para obtener la solución fijadora se realiza la siguiente mezcla:

- Glutaraldehido comercial (25%) 50 ml
- Solución amortiguadora 950 ml

Una vez pasadas las seis horas de la fijación se lavaron dos veces sucesivamente en tampón fosfato, centrifugandose durante diez minutos a 1.200 rpm a 4° C entre los lavados.

B. SEDIMENTACION.

Tras la fijación y lavado de las muestras se realizó la sedimentación sobre cubreobjetos recubiertos con poli-L-lisina basandonos en las descripciones de MAZIA y cols -135-, -136-, así como en los trabajos de SANDERS y cols -172-, ya que la poli-L-lisina permite que las células se adhieran firmemente a las superficies de vidrio o plásticas como las utilizadas en nuestro laboratorio (MACIAS - 130-). La adhesión se interpreta como la interacción entre las superficies celulares polianiónicas y la capa policatiónica de la poli-L-lisina (MAZIA y cols -136-).

Antes de la sedimentación propiamente dicha se procedió a la preparación del soporte. En este sentido los cubreobjetos fueron sumergidos en alcohol éter para eliminar la grasa superficial y seçados

al aire en placa de Petri. Una vez secos los cubreobjetos fueron situados en una cámara húmeda; sobre los mismos se deposita una gota de poli-L-lisina durante cuarenta y cinco minutos aproximadamente a temperatura ambiente. A continuación se procede al lavado con agua bidestilada, tras lo cual se vuelven a dejar secar, encontrándose una vez secos ya aptos para proceder a la sedimentación propiamente dicha.

Una vez realizadas las operaciones arriba descritas se procede a depositar una gota de sangre sobre el cubreobjeto, la cual se deja sedimentar en cámara húmeda a 4° C durante un tiempo mínimo de dos horas y un tiempo máximo de catorce horas.

C. DESHIDRATAACION.

La deshidratación de las muestras, una vez sedimentadas sobre el cubreobjeto recubierto de poli-L-lisina, se realizó en soluciones de acetona crecientes, con la siguiente pauta:

- Acetona 30%	5 minutos
- Acetona 50%	5 minutos
- Acetona 70%	5 minutos
- Acetona 90%	5 minutos
- Acetona 95%	5 minutos
- Acetona 100%	5 minutos
- Acetona anhidra	5 minutos
- Acetato de amilo	10 minutos

La deshidratación se realizó a 4° C según la técnica de FUJITA y cols - 78-,

D. PUNTO CRITICO.

Las muestras depositadas sobre los cubreobjetos son introducidas en unas rejillas metálicas y depositadas en la cámara de punto crítico, posteriormente se hace pasar a dicha cámara dióxido de carbono líquido, el cual se mantiene en ella durante unos dos minutos; esta maniobra se realiza varias veces hasta que el olor a acetato de amilo se hace inaparente por la válvula de expulsión. En una segunda fase se introduce de nuevo dióxido de carbono líquido y se eleva la temperatura a 35° C con lo cual el dióxido de carbono líquido se transforma en gas sin pasar por una fase límite, simultáneamente la presión se eleva hasta 80 bar, se libera el gas muy lentamente y se retira la muestra.

Este proceso se realizó con una cámara de punto crítico marca Polaron.

E. MONTAJE Y RECUBRIMIENTO.

Una vez realizado el punto crítico, las muestras se situaron sobre un portapreparaciones de aluminio para Microscopía Electrónica de Barrido modelo Phillips, utilizando como adherente y conductor la plata coloidal.

Seguidamente se procedió al recubrimiento de las muestras. Esta maniobra tiene por objeto asegurar la conductividad eléctrica desde la superficie de la muestra al soporte y el de obtener una superficie que pueda emitir un gran número de electrones secundarios mediante el bombardeo de electrones.

Desde las experiencias de JAUQUES y cols - 106 - en las que realizaban los revestimientos metálicos mediante la inmersión simple de las muestras en una solución alcohólica saturada de oro y posterior secado al aire, este punto ha sido muy discutido. Actualmente son dos los métodos más utilizados en el recubrimiento de especímenes para microscopía electrónica de barrido y estudio microanalítico: evaporación al vacío y recubrimiento con Sputtering.

En nuestro material se ha realizado un recubrimiento simple con oro en un Sputtering marca Polaron modelo E - 5.000 durante un tiempo aproximado de tres minutos de acuerdo con las pautas establecidas en nuestro laboratorio (MACIAS -130-).

F. OBSERVACION.

Las muestras fueron observadas en un microscopio electrónico de barrido marca Phillips modelo 505. Utilizando un voltaje comprendido entre 15 y 20 kv.

De cada una de las muestras se procedió al recuento de 100 elementos eritrocíticos, clasificandolos según su morfología de acuerdo con los criterios establecidos por BESSIS - 17-.

Asimismo se realizó una medición morfométrica del diámetro de los elementos, utilizando para ello la escala interna en micras, totalmente corregida respecto al aumento de la imagen.

Para dicho estudio se elaboró un modelo impreso que recogía las distintas características morfológicas y morfométricas objeto de nuestro estudio. El esquema básico de dicho modelo se representa en la figura 6. El conjunto de células contadas y medidas fue de 2.100.

Por último hemos de indicar que las microfotografías fueron realizadas con película Polaroid 52.

4.- METODOLOGIA ESTADISTICA.

Para comparar los parámetros bioquímicos en los distintos enfermos estudiados según sus diferentes situaciones se ha utilizado el test de Wilcoxon para valores apareados de distribución no paramétrica.

Para el estudio de la morfología y morfometría del hematíe se ha empleado la prueba de χ^2 para comparar la distribución de las formas en las diferentes situaciones y la t-Student con datos independientes para comparar las medias de los diámetros por cada forma y cada situación.

La correlación entre diámetros y parámetros bioquímicos dentro de cada forma y cada situación se estudió con el coeficiente de correlación de Pearson.

Los criterios de utilización de los test propuestos han sido los clásicamente establecidos para las pruebas biológicas (DOMENECH -55-, MARTIN y cols -134-).

RESULTADOS

Los resultados obtenidos pueden describirse subdividiendo los mismos en capítulos diferentes:

- 1.- Estudio Gasométrico.
- 2.- Estudio Hematimétrico.
- 3.- Estudio de los Metabolitos Purínicos.
- 4.- Estudio de los Nucleótidos Intraeritrocíticos.
- 5.- Estudio Microscópico:
 - A.- Morfológico.
 - B.- Morfométrico.
- 6.- Estudio de Correlación.

1.- Estudio Gasométrico:

Los estudios gasométricos realizados en sangre arterial (pH, pO_2 , pCO_2 y CO_3H^-) existentes en las tres situaciones previamente descritas se expresan en las tablas IV, V y VI. La comparación de muestras por el método estadístico de Wilcoxon se representa en la tabla VII.

2.- Estudio Hematimétrico:

Los resultados correspondientes a los tres grupos y a los distintos valores de hemoglobina, hematocrito, número de hemafes, volumen corpuscular medio, hemoglobina corpuscular media y concentración hemoglobínica corpuscular media se expresan en las tablas VIII, IX y X y el estudio estadístico comparado en la tabla XI.

3.- Estudio de los Metabolitos Purínicos:

Los resultados correspondientes a las determinaciones de inosina, hipoxantina y xantina en plasma, oxipurinas urinarias, así como de la uricemia, aclaramiento de creatinina y excreción fraccionada de uratos se expresan para los tres grupos objeto de nuestro estudio en las tablas XII, XIII y XIV. El análisis comparado que se desprende del estudio estadístico de los niveles arriba indicados se representa en la tabla XV.

TABLA.- IV

PARAMETROS GASOMETRICOS EN SITUACION SIN OXIGENO (G - I)				
CASO N°	pH	pO ₂ (mm Hg)	pCO ₂ (mm Hg)	CO ₃ H ⁻ (mEq/l)
1º	7.41	60	43	27.1
2º	7.37	46	56	32.3
3º	7.41	56	41	26.0
4º	7.38	55	47	27.8
5º	7.42	68	36	23.4
6º	7.37	53	45	26.1
7º	7.37	56	47	27.7
\bar{x}	7.39	56	45	27.2
D.E.	0.022	6.7	6.1	2.7

TABLA. - V

PARAMETROS GASOMETRICOS EN SITUACION CON OXIGENO (G - II)				
CASO N°	pH	pO ₂ (mm Hg)	pCO ₂ (mm Hg)	CO ₃ H ⁻ (mEq/l)
1º	7.35	99	52	29.1
2º	7.34	69	55	30.3
3º	7.39	73	44	26.6
4º	7.37	70	50	28.9
5º	7.39	106	43	27.0
6º	7.36	77	48	28.0
7º	7.32	63	55	29.0
\bar{x}	7.36	79	49	28.4
D.E.	0.025	16.3	4.8	1.3

TABLA.- VI

PARAMETROS GASOMETRICOS EN SITUACION CON ALOPURINOL (G - III)				
CASO N°	pH	pO ₂ (mm Hg)	pCO ₂ (mm Hg)	CO ₃ H ⁻ (mEq/l)
1°	7.41	67	44	28.4
2°	7.36	50	55	31.3
3°	7.41	59	37	23.7
4°	7.38	55	48	28.9
5°	7.43	68	39	26.3
6°	7.39	57	42	25.2
7°	7.38	50	43	26
\bar{x}	7.39	58	44	27.1
D.E.	0.023	7.3	6	2.5

TABLA.- VII

COMPARACION DE LOS DATOS GASOMETRICOS POR EL TEST DE WILCOXON			
	<u>G-I / G-II</u>	<u>G-I / G-III</u>	<u>G-II / G-III</u>
pH	0.0090***	0.1807 (NS)	0.0090***
pO ₂	0.0090***	0.1726 (NS)	0.0090***
pCO ₂	0.0140**	0.1763 (NS)	0.0139**
CO ₃ H ⁻	0.0754 (NS)	0.5000 (NS)	0.0579 (NS)

(NS) = No Significativo.

* p < 0.05

** p < 0.02

*** p < 0.01

TABLA.- VIII

VALORES HEMATIMETRICOS EN SITUACION SIN OXIGENO (G - I)						
CASO N°	Htíes ($10^6/\text{mm}^3$)	Hb (gr/dl)	Hcto (%)	VCM (μm^3)	CHM (pg)	CHCM (%)
1°	5.12	14.7	45.9	89.6	28.8	32.1
2°	5.92	17.3	57.2	96.7	29.3	30.2
3°	4.85	17.1	50.8	105.0	35.2	33.6
4°	5.72	16.9	53.3	93.1	29.5	31.7
5°	4.54	15.7	44.7	98.4	34.6	35.1
6°	4.68	15.2	44.5	95.1	32.5	34.2
7°	6.06	21.2	62.8	103.5	35.0	33.8
\bar{x}	5.27	16.8	51.3	97.3	32.1	32.9
D.E.	0.62	2.1	6.9	5.5	2.8	1.7

TABLA.- IX

VALORES HEMATIMETRICOS EN SITUACION CON OXIGENO (G - II)						
CASO N°	Htles ($10^6/\text{mm}^3$)	Hb (gr/dl)	Hcto (%)	VCM (μm^3)	CHM (pg)	CHCM (%)
1°	4.73	13.7	42.2	89.3	28.9	32.4
2°	6.00	18.4	56.8	94.6	30.6	32.4
3°	4.90	16.6	46.7	95.3	33.8	35.5
4°	5.63	17.3	52.0	92.4	30.7	33.3
5°	4.73	15.4	45.0	95.1	32.5	34.5
6°	4.81	15.1	44.1	91.7	31.4	34.2
7°	5.43	20.0	56.0	103.1	36.8	35.7
\bar{x}	5.17	16.6	48.9	94.5	32.1	34
D.E.	0.51	2.1	5.9	4.3	2.5	1.3

TABLA. - X

VALORES HEMATIMETRICOS EN SITUACION CON ALOPURINOL (G - III)						
CASO N°	Htíes ($10^6/\text{mm}^3$)	Hb (gr/dl)	Hcto (%)	VCM (μm^3)	CHM (pg)	CHCM (%)
1°	4.76	13.7	42.5	89.2	28.8	32.3
2°	5.90	18.2	55.5	94.0	30.8	32.8
3°	4.94	17.2	48.9	99.0	34.8	35.1
4°	5.60	17.4	50.6	90.3	31.1	34.4
5°	4.44	15.0	42.2	95.0	33.8	35.5
6°	4.84	15.4	44.5	92.0	31.8	34.6
7°	5.63	19.7	55.9	99.2	35.0	35.3
\bar{x}	5.15	16.6	48.5	94.1	32.3	34.2
D.E.	0.54	2.0	5.7	3.9	2.3	1.2

TABLA.- XI

COMPARACION DE LOS VALORES HEMATIMETRICOS POR EL TEST DE WILCOXON			
	G-I / G-II	G-I / G-III	G-II / G-III
Htíes	0.3677 (NS)	0.1184 (NS)	0.5000 (NS)
Hb	0.1990 (NS)	0.3061 (NS)	0.4583 (NS)
Hcto	0.0140**	0.0139**	0.3061 (NS)
VCM	0.009***	0.009***	0.2495 (NS)
CHM	0.4329 (NS)	0.3677 (NS)	0.1990 (NS)
CHCM	0.0315*	0.0090***	0.1990 (NS)

(NS) = No Significativo.

* $p < 0.05$

** $p < 0.02$

*** $p < 0.01$

TABLA. - XII

DETERMINACIONES DE LOS METABOLITOS PURINICOS EN SITUACION SIN OXIGENO (G - I).

CASO Nº	CCr ml/mín $\frac{2}{1.73 \text{ m}^2}$	PUr mg/dl	CUr/CCr %	Hxp	Xp µM	Inop	Hxo	Xo mmol/gr Cr	AUb	PTo
1º	91	6.4	3.75	1.4	0.5	0.3	0.020	0.030	1.620	1.670
2º	122	6.9	4.08	1.0	0.3	0.1	0.032	0.008	1.990	2.030
3º	124	3.2	5.85	2.3	0.7	0.6	0.018	0.008	0.980	1.006
4º	115	7.1	4.45	0.5	0.1	0.0	0.022	0.008	1.860	1.890
4º	128	6.7	4.20	1.8	0.2	0.0	0.023	0.014	1.670	1.707
6º	150	6.9	2.92	1.2	0.2	0.0	0.016	0.003	1.490	1.509
7º	87	6.3	4.13	0.7	0.2	0.0	0.031	0.012	1.523	1.566
\bar{x}	116	6.2	4.13	1.2	0.3	0.1	0.023	0.011	1.590	1.625
D.E.	21	1.3	0.88	0.6	0.2	0.2	0.006	0.008	0.323	0.327

TABLA. - XIII I

DETERMINACIONES DE LOS METABOLITOS PURINICOS EN SITUACION CON OXIGENO (G - II).

CASO Nº	CO ₂	PUr	CUr/CO ₂	H ₂ O	X _p	Inop	H ₂ O	X _o	AU _o	PT _o
	ml/min <u>1.73 m²</u>	mg/dl	%	µM	µM			mmol/gr Cr		
1º	91	4.9	3.68	1.0	0.4	0.4	0.020	0.011	1.080	1.111
2º	167	4.0	5.78	1.3	0.3	0.6	0.062	0.021	2.400	2.483
3º	138	4.1	3.42	1.2	0.3	0.5	0.025	0.006	0.980	1.011
4º	146	3.2	5.65	2.2	0.6	0.5	0.037	0.014	1.660	1.711
5º	77	4.8	7.57	1.1	0.6	0.4	0.014	0.004	1.530	1.548
6º	129	6.0	3.11	1.2	0.9	0.0	0.020	0.009	1.420	1.449
7º	94	5.9	7.63	0.3	0.1	0.0	0.024	0.012	2.769	2.805
\bar{x}	120	4.7	5.26	1.1	0.4	0.3	0.028	0.011	1.691	1.731
D.E.	33	1.0	1.90	0.5	0.2	0.2	0.016	0.005	0.663	0.675

TABLA.- XIV

DETERMINACIONES DE LOS METABOLITOS PURINICOS EN SITUACION CON ALOPURINOL (G - III).

CASO Nº	CCr ml/min $\frac{2}{1.73 m^2}$	Pur mg/dl	Cur/CCr %	Hcp	Xp μM	Inop	Hxo	Xo mmol/gr Cr	Alb	PTo
1º	90	3.4	5.02	2.74	8.12	0.66	0.070	0.300	1.020	1.390
2º	178	3.0	3.38	2.30	4.71	0.29	0.102	0.258	1.280	1.640
3º	96	1.9	7.05	3.14	3.00	0.90	0.074	0.086	0.670	0.830
4º	113	4.0	1.74	2.31	6.80	0.57	0.152	0.242	1.020	1.414
5º	116	3.0	4.76	3.08	6.48	0.48	0.150	0.410	0.830	1.390
6º	115	3.0	3.67	3.20	9.33	1.04	0.050	0.120	0.870	0.950
7º	92	2.6	3.83	2.55	6.24	0.00	0.060	0.248	0.725	1.035
\bar{x}	114	2.9	4.20	2.76	6.38	0.56	0.094	0.237	0.916	1.235
D.E.	30	0.6	1.64	0.38	2.08	0.35	0.042	0.108	0.208	0.297

TABLA.- XV

COMPARACION DE LAS DETERMINACIONES DE LOS METABOLITOS PURINICOS
POR EL TEST DE WILCOXON.

	G-I / G-II	G-I / G-III	G-II / G-III
CCr	0.3766 (NS)	0.2495 (NS)	0.1090 (NS)
PUr	0.0260*	0.0090***	0.0140**
CUr/CCr	0.0881 (NS)	0.3061 (NS)	0.0090***
Hxp	0.2315 (NS)	0.0090***	0.0090***
Xp	0.2315 (NS)	0.0090***	0.0090***
Inop	0.0398*	0.0139**	0.0835 (NS)
Hxo	0.2315 (NS)	0.0090***	0.0090***
Xo	0.4583 (NS)	0.0090***	0.0090***
AUo	0.4583 (NS)	0.0090***	0.0090***
PTo	0.4329 (NS)	0.0090***	0.0315*

(NS) = No significativo

* $p < 0.05$

** $p < 0.02$

*** $p < 0.01$

4.- Estudio de los Nucleótidos Intraeritrocitarios:

Los resultados correspondientes a los tres grupos y a los distintos valores de ATP, ADP, AMP e IMP se expresan en las tablas XVI, XVII y XVIII y el estudio estadístico comparado en la tabla XIX.

5.- Estudio Microscópico:

A.- Estudio Morfológico:

En relación con los resultados relativos a los estudios morfológicos describiremos en primer lugar esquemáticamente los tipos eritrocíticos observados en nuestro material en los distintos grupos de estudio y en segundo lugar las variaciones porcentuales de dichos elementos así como los resultados del análisis estadístico efectuado sobre los mismos.

Los elementos observados son los siguientes:

DISCOCITOS:

Microscópicamente ofrecen una forma de disco bicóncavo, cuyas cavidades se ubican en el centro de las respectivas superficies en las que asientan. Constituyen los elementos básicos de las muestras estudiadas (Figuras 7a y 8d).

ERITROCITOS:

Variedad eritrocítica muy semejante a la previamente

TABLA. - XVI

NIVELES INTRAERITROCITARIOS DE NUCLEOTIDOS PURINICOS EN SITUACION SIN OXIGENO (G - 1).

CASO N°	ATP	ADP (mmol / 10 ⁶ células)	AMP	UMP
1°	140	18	0.6	0
2°	130	19	1.1	1.3
3°	157	20	0.9	0
4°	122	19	0.8	2.6
5°	172	23	5.3	1.3
6°	196	27	0	1.6
7°	135	29	2.8	0.2
\bar{x}	150	22	1.6	1.0
D.E.	26	4.3	1.8	0.9

TABLA .- XVII

NIVELES INTRAERITROCITARIOS DE NUCLEOTIDOS PURINICOS EN SITUACION
CON OXIGENO (G - II).

CASO N°	ATP	ADP (mmol / 10 ⁶ células)	AMP	IMP
1º	121	19	0	2.1
2º	147	22	0.5	1.3
3º	163	22	0.6	1.7
4º	139	22	0.6	0.6
5º	182	23	1.1	0.9
6º	194	24	0	1.7
7º	110	25	8.8	3.5
\bar{x}	150	22.4	1.6	1.6
D.E.	30	1.9	3.1	0.9

TABLA.- XVIII

NIVELES INTRAERITROCITARIOS DE NUCLEOTIDOS PURINICOS EN SITUACION
CON ALOPURINOL (G - III).

CASO Nº	ATP	AMP (mmol / 10 ⁶ células)		IMP
1º	134	18	0.7	9.4
2º	147	22	0	1.3
3º	162	22	1.7	3.0
4º	117	18	0.8	4.0
5º	177	27	1.2	1.0
6º	200	25	0	1.3
7º	140	31	12.7	4.4
\bar{x}	153	23.2	2.4	3.4
D.E.	28	4.7	4.5	2.9

TABLA.- XIX

RESULTADOS DEL ANALISIS COMPARADO DE LOS NIVELES DE NUCLEOTIDOS PURINICOS INTRAERITROCITARIOS EN LAS TRES SITUACIONES EN ESTUDIO POR EL TEST DE WILCOXON.

	<u>G-I / G-II</u>	<u>G-I / G-II</u>	<u>G-II / G-III</u>
IMP	0.1727 (NS)	0.0579 (NS)	0.0374*
ATP	0.5000 (NS)	0.2234 (NS)	0.3001 (NS)
ADP	0.4583 (NS)	0.0865 (NS)	0.2501 (NS)
AMP	0.1727 (NS)	0.3429 (NS)	0.0139**

(NS) = No Significativo.

* $p < 0.05$

** $p < 0.02$

descrita se caracteriza por ofrecer una imagen de anillo con una región central sumamente delgada que configura unas cavidades, del mismo modo, concéntricas pero de morfología semicilíndrica.

CODOCITOS:

Constituyen elementos caracterizados por una morfología en campana o en sombrero mejicano. El eje de esta protusión campaniforme adopta grados de elevación muy variables (Figuras 8c y 10d).

ESTOMATOCITOS:

La morfología de los estomatocitos observados en nuestro material adopta la imagen unicóncava característica de estos elementos (Figuras 7b, 9a y 9b). Existen gradaciones morfológicas que conducen a la aparición de elementos con imagen ESFEROESTOMATOCITICA (Figuras 8a y 8b).

LEPTOCITOS:

Los leptocitos presentes en nuestro material ofrecen morfológicamente una imagen aplanada carente de cavidades características del discocito bicóncavo. Generalmente la superficie de estos elementos muestra un carácter relativamente rugoso a diferencia del predominante liso que se aprecia en las formas discocíticas.

KINIZOCITOS:

La morfología de los elementos kinizocíticos muestra la característica imagen tricóncava o " en pellizco ". Habitualmente existen diferencias en la profundidad de las distintas cavidades existentes en estos elementos (Figuras 7b, 9a y 10b).

ELIPTOCITOS:

Elemento semejante al discocito bicóncavo cuya imagen genérica ofrece un carácter elíptico con los extremos laterales discretamente engrosados. Sus cavidades concéntricas, en general, muestran una escasa profundidad.

ESFEROCITOS:

Constituyen elementos eritrocíticos de forma esférica que poseen una superficie lisa asiendo de pequeñas rugosidades.

Los esferocitos ofrecen formas mixtas frecuentes destacando en nuestro material la esferoestomatocítica ya descrita.

ESQUIZOCITOS:

La morfología de los elementos esquizocíticos se caracteriza por ofrecer una imagen piriforme aplanada en la que se observa una cavidad unicóncava de diametro variable y de carácter, en general, excéntrico (Figura 10c).

DACRIOCITOS:

Constituyen elementos, denominados tambien " células en raqueta de tenis " o " células en gota de lágrima ", que ofrecen una imagen semejante a los esquizocitos; presentan a diferencia de estos un extremo o prolongación que aumenta el carácter piriforme y/o triangular. La cavidad unicóncava, frecuentemente excéntrica, muestra una mayor profundidad que en los elementos anteriormente descritos (Figura 10a).

KERATOCITOS:

Elementos cuya morfoestructura microscópica se caracteriza por presentar una imagen generalmente aplanada asiento de dos o más prolongaciones periféricas de escaso grosor. Los márgenes de los keratocitos ofrecen, con relativa frecuencia, un carácter ondulado (Figura 10b).

El estudio porcentual individualizado para cada paciente en las tres situaciones descritas en el capítulo metodológico y con carácter global se expresa en las tablas XX, XXI, XXII y XXIII.

La tabla XXIV representa los valores promedio de los elementos eritrocíticos asimismo en las tres situaciones de nuestro estudio.

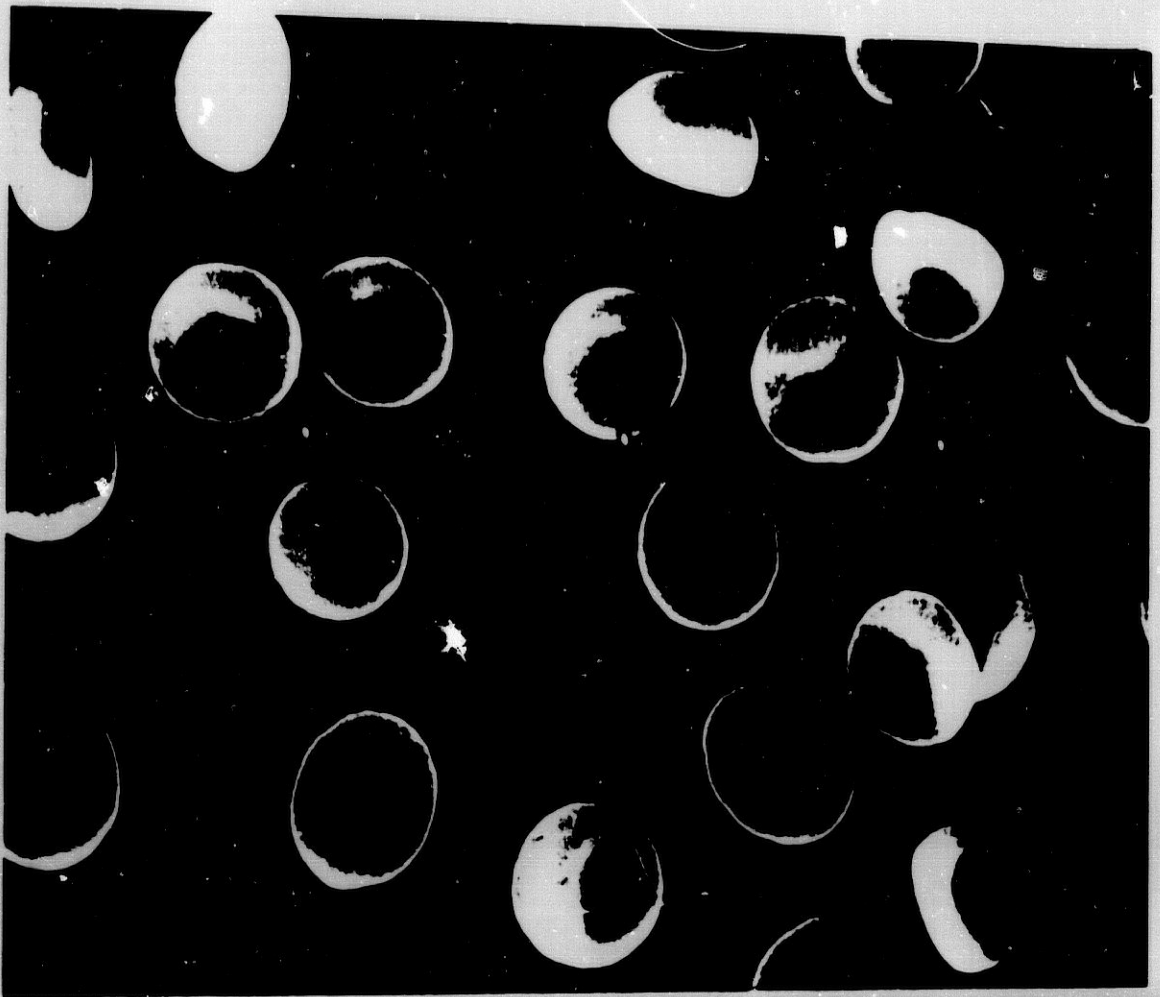
Estos resultados se expresan gráficamente en las figuras 11 y 12.

Para estudiar la repartición de las formas eritrocitarias en las distintas situaciones se aplica el test de χ^2 para lo cual se agrupan los tipos que tienen en conjunto menos de diez elementos denominandolos " RESTO ". La distribución de los valores promedio de las formas eritrocíticas ordenadas por su frecuencia tras la transformación efectuada se representa posteriormente (Tablas XXV y XXVI).

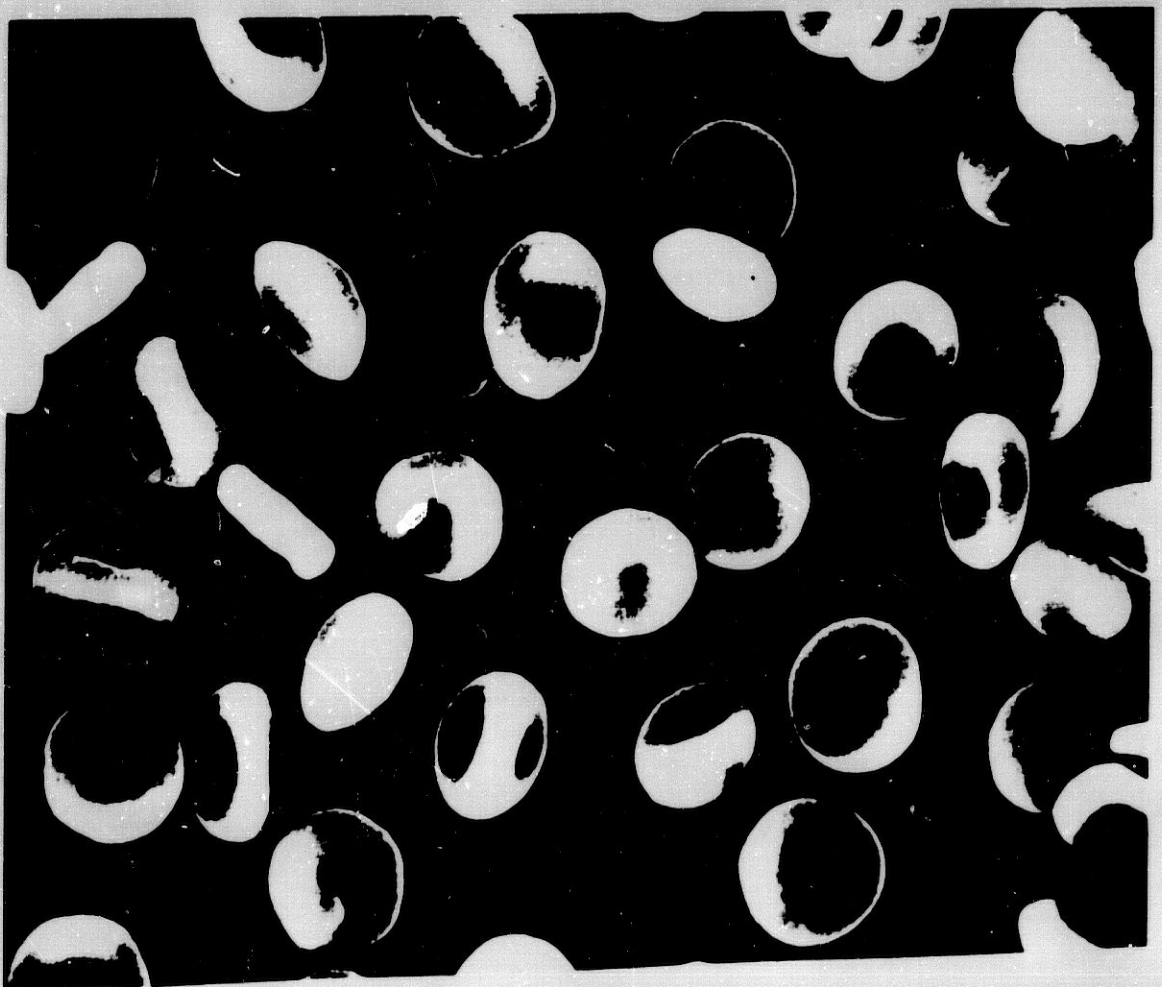
FIGURA 7: Microfotografías de M.E.B. donde mostramos:

a) Discocitos (5.200 X).

b) Kinizocitos, estomatocitos y discocitos (5.000 X).



a)



b)

FIGURA 8: Microfotografías de M.E.B. que muestran:

- a) Esferoestomatocito (14.000 X).
- b) Esferoestomatocito (7.700 X).
- c) Codocito (10.000 X).
- d) Discocito y estomatocito (10.000 X).



a)



b)



c)



d)

FIGURA 9: Microfotografías de diversos elementos eritrocíticos:
a) Kinizocito, estomatocitos y discocitos (8.400 X).
b) Estomatocitos y esferoestomatocitos (8.000 X).



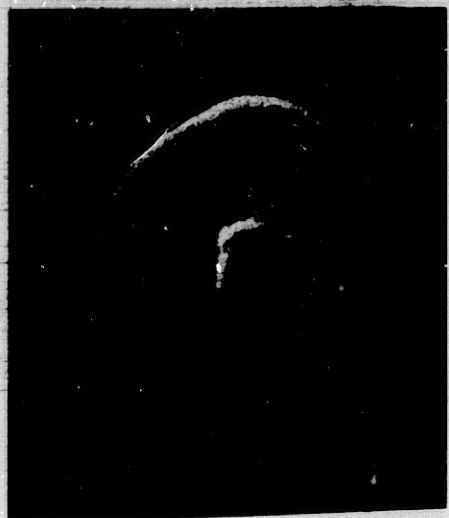
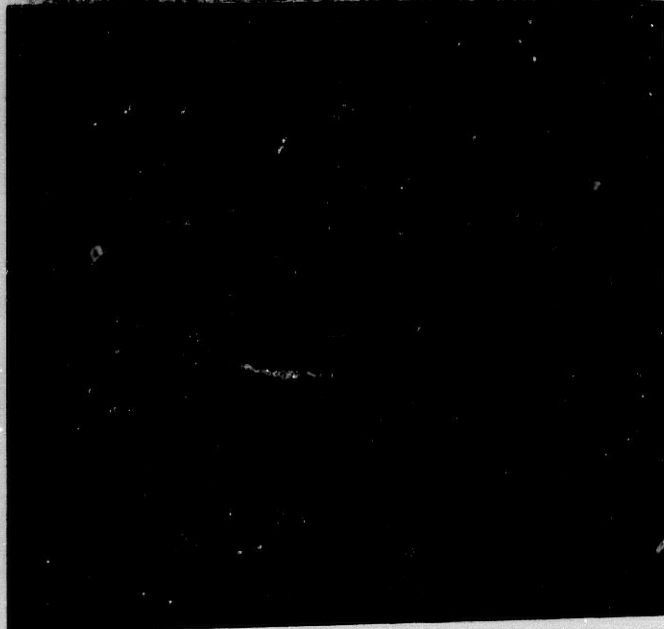
a)



b)

FIGURA 10: Microfotografías de M.E.B. donde se muestran:

- a) Dacriocito (14.000 X).
- b) Kinizocito y keratocito (5.900 X).
- c) Esquizocito (14.800 X).
- d) Codocito (8.000 X).



c)

b)

d)

TABLA.- XXIII

DISTRIBUCION DE LAS FORMAS ERITROCITICAS CON CARACTER GLOBAL EN LAS TRES SITUACIONES EN ESTUDIO.				
FORMAS	G - I	G - II	G - III	TOTAL
DISCOCITOS	368	494	444	1306
TOROCITOS	9	18	10	37
CODOCITOS	36	32	33	101
ESTOMATOCITOS	167	84	102	353
LEPTOCITOS	5	1	3	9
ESFEROESTOMAT.	60	23	39	122
KINIZOCITOS	32	41	31	104
ELIPTOCITOS	1	0	6	7
ESFEROCITOS	10	2	12	24
DACRIOCITOS	1	0	2	3
ESQUIZOCITOS	11	3	16	30
KERATOCITOS	0	2	2	4
TOTAL	700	700	700	2100

TABLA.- XXIV

VALORES PROMEDIO DE LOS TIPOS ERITROCITICOS EN LAS TRES SITUACIONES			
TIPOS	<u>G - I</u>	<u>G - II</u>	<u>G - III</u>
DISCOCITOS	52.57	70.57	63.43
TOROCITOS	1.29	2.57	1.43
CODOCITOS	5.14	4.57	4.71
ESTOMATOCITOS	23.86	12.00	14.57
LEPTOCITOS	0.71	0.14	0.43
ESFEROESTOMAT.	8.57	3.29	5.57
KINIZOCITOS	4.57	5.86	4.43
ELIPTOCITOS	0.14	0.0	0.86
ESFEROCITOS	1.43	0.29	1.71
DACRIOCITOS	0.14	0.0	0.29
ESQUIZOCITOS	1.57	0.43	2.29
KERATOCITOS	0.0	0.29	0.29

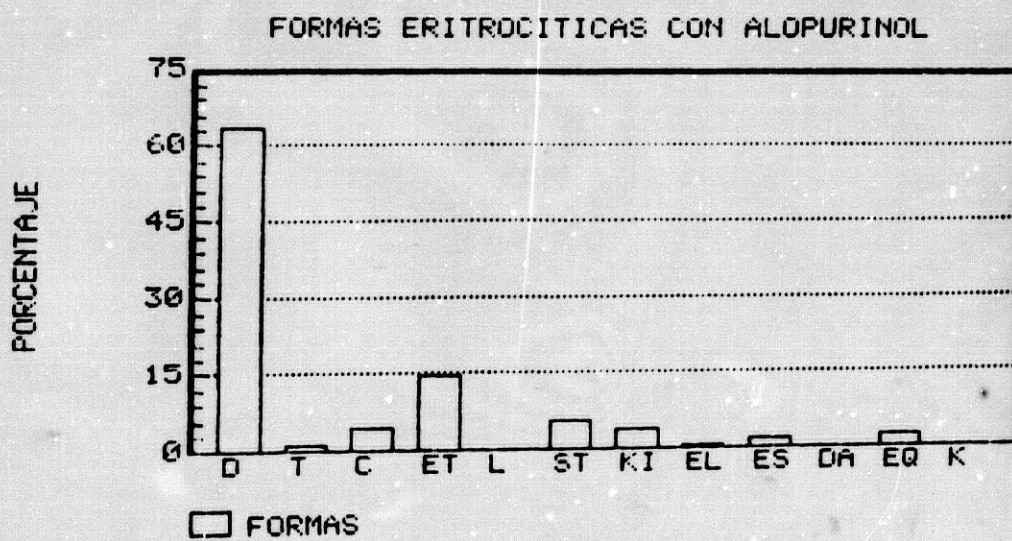
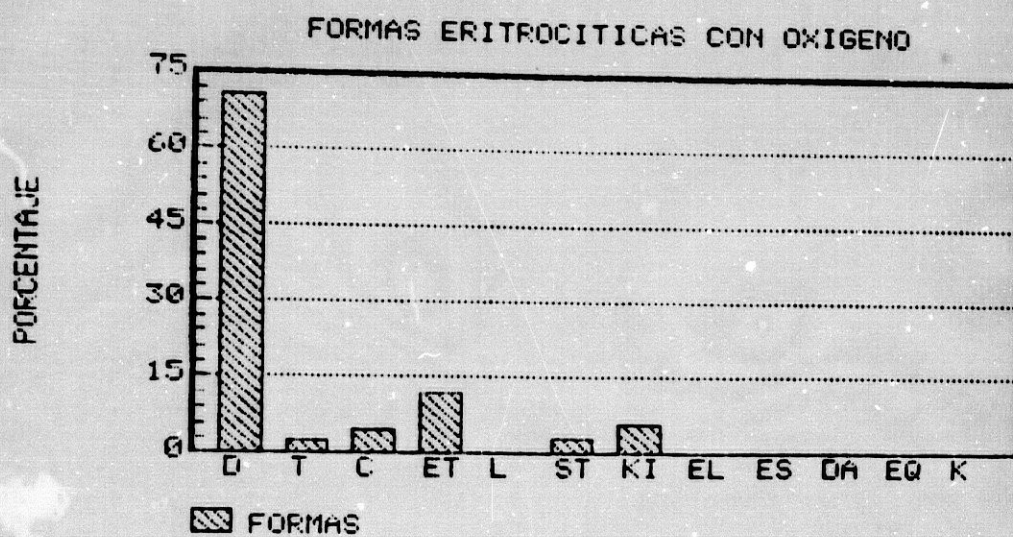


FIGURA 11.

DISTRIBUCION DE LAS FORMAS ERITROCITICAS

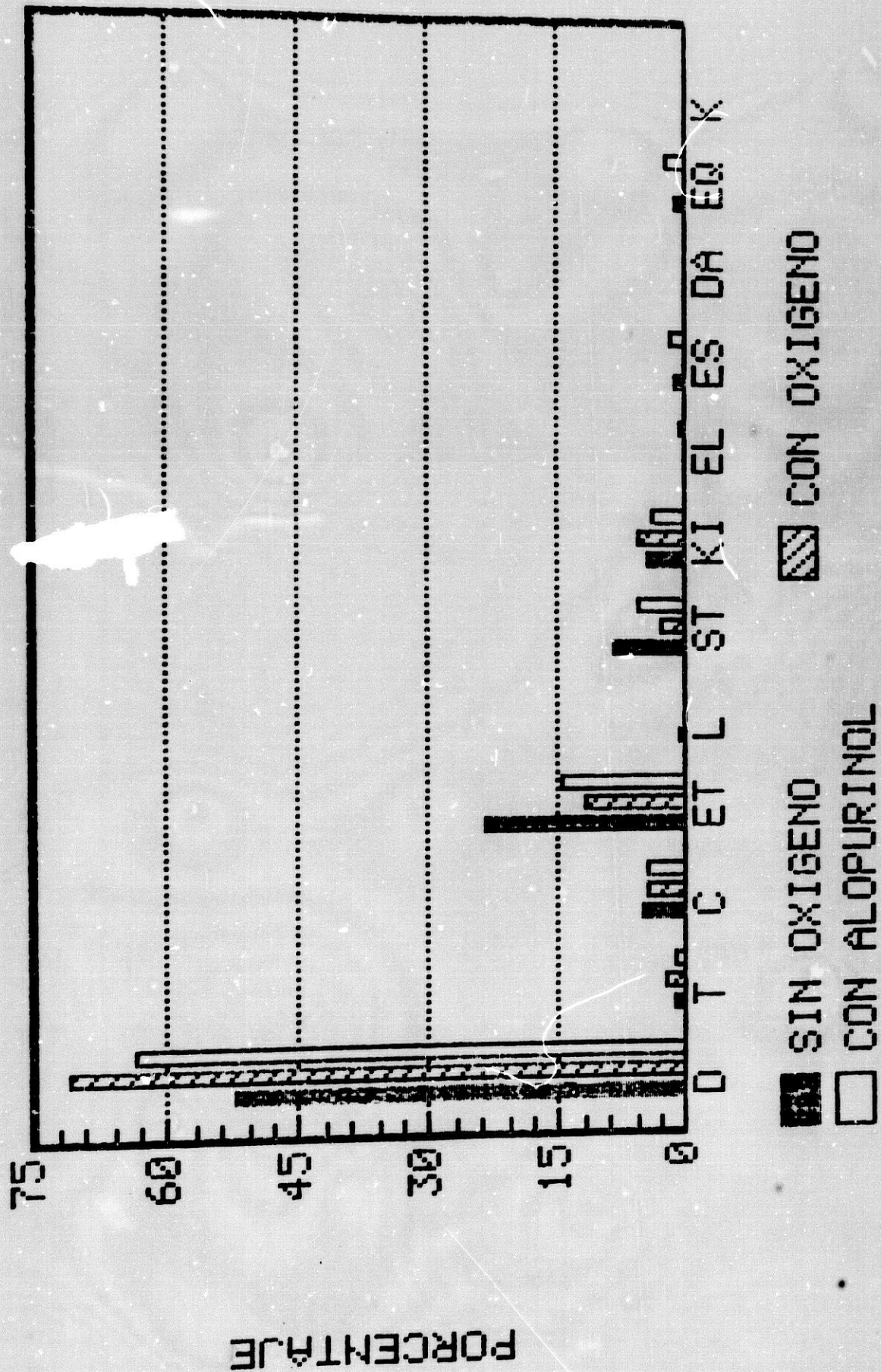


FIGURA 12.

TABLA.- XXV

DISTRIBUCION DE LAS FORMAS ERITROCITICAS CON CARACTER GLOBAL TRAS LA TRANSFORMACION EFECTUADA EN LAS TRES SITUACIONES EN ESTUDIO.

<u>FORMAS</u>	<u>G - I</u>	<u>G - II</u>	<u>G - III</u>	<u>TOTAL</u>
DISCOCITOS	368	494	444	1306
ESTOMATOCITOS	167	84	102	353
ESFEROESTOMAT.	60	23	39	122
KINIZOCITOS	32	41	31	104
CODOCITOS	36	32	33	101
TOROCITOS	9	18	10	37
ESQUIZOCITOS	11	3	16	30
ESFEROCITOS	10	2	12	24
RESTO	7	3	13	23
<u>TOTAL</u>	<u>700</u>	<u>700</u>	<u>700</u>	<u>2100</u>

TABLA.- XXVI

DISTRIBUCION DE LOS VALORES PROMEDIO DE LOS TIPOS ERITROCITICOS TRAS LA TRANSFORMACION EFECTUADA EN LAS TRES SITUACIONES EN ESTUDIO.			
	<u>G - I</u>	<u>G - II</u>	<u>G - III</u>
DISCOCITOS	52.57	70.57	63.43
ESTOMATOCITO	23.86	12.00	14.57
ESFEROESTOMAT.	8.57	3.29	5.57
KINIZOCITOS	4.57	5.86	4.43
CODOCITOS	5.14	4.57	4.71
TOROCITOS	1.29	2.57	1.43
ESQUIZOCITOS	1.57	0.43	2.29
ESFEROCITOS	1.43	0.29	1.71
RESTO	1.00	0.43	1.86
	<u>100 %</u>	<u>100 %</u>	<u>100 %</u>

Los resultados obtenidos tras el análisis comparativo de la distribución global se expresan en la tabla XXVII.

Dado que la repartición de formas no es similar en las distintas situaciones, en aras de localizar el/los tipo/s celular/es básico/s que condiciona/n el resultado anterior aplicamos nuevamente el test de χ^2 para cada forma celular (Tablas XXVIII, XXIX, XXX y XXXI).

TABLA.- XXVII

RESULTADOS DEL ANALISIS COMPARATIVO MEDIANTE EL TEST DE χ^2 DE LA DISTRIBUCION PORCENTUAL DE LAS FORMAS CELULARES EN LAS TRES SITUACIONES EN ESTUDIO

	χ^2 VALOR	GRADOS LIBERTAD	SIGNIFICACION
G-I / G-II	78.208	8	$p < 0.0001$
G-I / G-III	30.381	8	$p < 0.0002$
G-II / G-III	34.514	8	$p < 0.0001$

TABLA .- XXVIII

PRUEBA DE LA χ^2 APLICADA A LOS DISTINTOS TIPOS ERITROCITICOS
EN LAS SITUACIONES SIN Y CON OXIGENO (G-I / G-II).

	χ^2 VALOR	GRADOS LIBERTAD	SIGNIFICACION
DISCOCITOS	47.927	1	p < 0.0001
ESTOMATOCITOS	33.442	1	p < 0.0001
ESFEROESTOMAT.	17.553	1	p < 0.0001
KINIZOCITOS	1.171	1	0.2793 (NS)
CODOCITOS	0.247	1	0.6190 (NS)
TOROCITOS	3.059	1	0.0803 (NS)
ESQUIZOCITOS	4.618	1	0.0316*
ESFEROCITOS	5.379	1	0.0204*
RESTO	1.611	1	0.2043 (NS)

* p < 0.05

TABLA.- XIX

PRUEBA DE LA χ^2 APLICADA A LOS DISTINTOS TIPOS ERITROCITICOS
EN LAS SITUACIONES SIN OXIGENO Y CON ALOPURINOL (G-I / G-III)

	χ^2 VALOR	GRADOS LIBERTAD	SIGNIFICACION
DISCOCITOS	16.936	1	p < 0.0001
ESTOMATOCITOS	19.442	1	p < 0.0001
ESFEROESTOMAT.	4.793	1	0.0286*
KINIZOCITOS	0.017	1	0.8977 (NS)
CODOCITOS	0.137	1	0.7112 (NS)
TOROCITOS	0.053	1	0.8174 (NS)
ESQUIZOCITOS	0.944	1	0.3312 (NS)
ESFEROCITOS	0.185	1	0.6675 (NS)
RESTO	1.826	1	0.1766 (NS)

* p < 0.05

TABLA.- XXX

PRUEBA DE LA χ^2 APLICADA A LOS DISTINTOS TIPOS ERITROCITICOS EN LAS SITUACIONES CON OXIGENO Y CON ALOPURINOL (G-II / G-III).

	χ^2 VALOR	GRADOS LIBERTAD	SIGNIFICACION
DISCOCITOS	8.076	1	0.0045***
ESTOMATOCITOS	2.009	1	0.1564 (NS)
ESFEROESTOMAT.	4.320	1	0.0377*
KINIZOCITOS	1.464	1	0.2263 (NS)
CODOCITOS	0.016	1	0.8993 (NS)
TOROCITOS	2.332	1	0.1276 (NS)
ESQUIZOCITOS	9.017	1	0.0027***
ESFEROCITOS	7.215	1	0.0072***
RESTO	6.322	1	0.0119**

* $p < 0.05$

** $p < 0.02$

*** $p < 0.01$

TABLA.- XXXI

PRUEBA DE LA χ^2 APLICADA A LOS DISTINTOS TIPOS ERITROCITICOS
EN TODAS LAS SITUACIONES.

	<u>G-I / G-II</u>	<u>G-I / G-III</u>	<u>G-II / G-III</u>
DISCOCITOS	p < 0.0001	p < 0.0001	p < 0.01
ESTOMATOCITOS	p < 0.0001	p < 0.0001	NS
ESFEROESTOMAT.	p < 0.0001	p < 0.05	p < 0.05
KINIZOCITOS	NS	NS	NS
COJOCITOS	NS	NS	NS
TOROCITOS	NS	NS	NS
ESQUIZOCITOS	p < 0.05	NS	p < 0.01
ESFEROCITOS	p < 0.05	NS	p < 0.01
RISTO	NS	NS	p < 0.02

B.- Estudio Morfométrico:

Para expresar los datos morfométricos relativos a los distintos elementos eritrocitarios describiremos pormenorizadamente en primer lugar los datos de cada uno de los pacientes en las tres situaciones objeto de nuestro estudio (Tablas XXXII a la LII).

En segundo lugar y en las tablas LIII a LXIV expresaremos el diámetro medio y las desviaciones estandar de los distintos elementos eritrocitarios de igual modo en cada uno de los sujetos y situaciones. Dichos resultados se expresan gráficamente para los discocitos y estomatocitos en las figuras 13 y 14.

Una vez descritos los valores relativos a cada caso estudiado expondremos nuestros resultados a propósito de una valoración media global (Tabla LXV).

Finalmente representaremos los resultados del estudio estadístico realizado aplicando a estos datos el test de Student (Tabla LXVI).

TABLA.- XXXII

DIAMETRO Y MORFOLOGIA DE LOS ELEMENTOS PRESENTES EN EL ENFERMO N° 1 EN SITUACION SIN OXIGENO (G - I).									
MORFOLOGIA	DIAMETROS*								TOTAL
	4.5	5	5.5	6	6.5	7	7.5	8	
DISCOCITOS				10	16	20	8	1	55
TOROCITOS									
CODOCITOS									
ESTOMATOCITOS			1	10	4	5	1		21
LEPTOCITOS									
ESFEROESTOMATOCITOS				10	2				12
KINIZOCITOS				1					1
ELIPTOCITOS				1					1
ESFEROCITOS			1	4					5
DACRIOCIOS									
ESQUIZOCITOS			1	2	1	1	1		5
KERATOCITOS									
TOTAL			3	38	23	26	9	1	100

* Micras

TABLA.- XXXIII

DIAMETRO Y MORFOLOGIA DE LOS ELEMENTOS PRESENTES EN EL ENFERMO N° 2 EN SITUACION SIN OXIGENO (G - I).									
MORFOLOGIA	DIAMETROS*								TOTAL
	4.5	5	5.5	6	6.5	7	7.5	8	
DISCOCITOS				24	14	6	1		45
TOROCITOS				1	1				2
CODOCITOS				2		1			3
ESTOMATOCITOS			2	20	5	1	1		29
LEPTOCITOS									
ESFEROESTOMATOCITOS			2	5	1				8
KINIZOCITOS			1	9	1				11
ELIPTOCITOS									
ESFEROCITOS			1						1
DACRIOCIOS									
ESQUIZOCITOS		1							1
KERATOCITOS									
TOTAL		1	6	61	22	8	2		100

* Micras

TABLA.- XXXIV

DIAMETRO Y MORFOLOGIA DE LOS ELEMENTOS PRESENTES EN EL ENFERMO N° 3 EN SITUACION SIN OXIGENO (G - I).									
MORFOLOGIA	DIAMETROS*								TOTAL
	4.5	5	5.5	6	6.5	7	7.5	8	
DISCOCITOS			4	34	17	4			59
TOROCITOS				1					1
CODOCITOS			3	1	1				5
ESTOMATOCITOS			4	13	1				18
LEPTOCITOS									
ESFEROESTOMATOCITOS			2	10					12
KINIZOCITOS			1	2					3
ELIPTOCITOS									
ESFEROCITOS			1						1
DACRIOCITOS									
ESQUIZOCITOS		1							1
KERATOCITOS									
TOTAL		1	15	61	19	4			100

* Micras

TABLA.- XXXV

DIAMETRO Y MORFOLOGIA DE LOS ELEMENTOS PRESENTES EN EL ENFERMO N° 4 EN SITUACION SIN OXIGENO (G - I).								
MORFOLOGIA	DIAMETROS*							TOTAL
	4.5	5	5.5	6	6.5	7	7.5	
DISCOCITOS				16	20	6	3	45
TOROCITOS				2	1			3
CODOCITOS				4		1		5
ESTOMATOCITOS			2	14	12	2		30
LEPTOCITOS								
ESFEROESTOMATOCITOS				5	3			8
KINIZOCITOS			1	1	3			5
ELIPTOCITOS								
ESFEROCITOS			1	1				2
DACRIOCITOS								
ESQUIZOCITOS		1		1				2
KERATOCITOS								
TOTAL		1	4	44	39	9	3	100

* Micras

TABLA.- XXXVI

DIAMETRO Y MORFOLOGIA DE LOS ELEMENTOS PRESENTES EN EL ENFERMO N° 5 EN SITUACION SIN OXIGENO (G - I).									
MORFOLOGIA	DIAMETROS*								TOTAL
	4.5	5	5.5	6	6.5	7	7.5	8	
DISCOCITOS			11	21	17	5			54
TOROCITOS									
CODOCITOS			1	6	3				10
ESTOMATOCITOS			3	11	10				24
LEPTOCITOS									
ESFEROESTOMATOCITOS			1	6	2				9
KINIZOCITOS			1						1
ELIPTOCITOS									
ESFEROCITOS									
DACRIOCITOS				1					1
ESQUIZOCITOS				1					1
KERATOCITOS									
TOTAL			17	46	32	5			100

* Micras

TABLA.- XXXVII

DIAMETRO Y MORFOLOGIA DE LOS ELEMENTOS PRESENTES EN EL ENFERMO N° 6 EN SITUACION SIN OXIGENO (G - I).									
MORFOLOGIA	DIAMETROS*							TOTAL	
	4.5	5	5.5	6	6.5	7	7.5		8
DISCOCITOS			7	32	8	3			50
TOROCITOS									
CODOCITOS			1	3					4
ESTOMATOCITOS			21	9					30
LEPTOCITOS									
ESFEROESTOMATOCITOS		1	8						9
KINIZOCITOS			2	4					6
ELIPTOCITOS									
ESFEROCITOS		1							1
DACRIOCITOS									
ESQUIZOCITOS									
KERATOCITOS									
TOTAL		2	39	48	8	3			100

* Micras

TABLA.- XXXVIII

DIAMETRO Y MORFOLOGIA DE LOS ELEMENTOS PRESENTES EN EL ENFERMO N° 7
EN SITUACION SIN OXIGENO (G - I).

MORFOLOGIA	DIAMETROS*								TOTAL
	4.5	5	5.5	6	6.5	7	7.5	8	
DISCOCITOS				13	32	15			60
TOROCITOS				2		1			3
CODOCITOS			1	1	7				9
ESTOMATOCITOS			3	4	6	2			15
LEPTOCITOS				1	1	2		1	5
ESFEROESTOMATOCITOS				2					2
KINIZOCITOS			2	3					5
ELIPTOCITOS									
ESFEROCITOS									
DACRIOCIOS									
ESQUIZOCITOS		1							1
KERATOCITOS									
TOTAL		1	6	26	46	20		1	100

* Micras

TABLA.- XXXIX

DIAMETRO Y MORFOLOGIA DE LOS ELEMENTOS PRESENTES EN EL ENFERMO N° 1 EN SITUACION CON OXIGENO (G - II).									
MORFOLOGIA	DIAMETROS*								TOTAL
	4.5	5	5.5	6	6.5	7	7.5	8	
DISCOCITOS				29	21	10	1		61
TOROCITOS				2	5	2			9
CODOCITOS				1	5	1			7
ESTOMATOCITOS			1	7	6	3			17
LEPTOCITOS									
ESFEROESTOMATOCITOS			1	2	1	1			5
KINIZOCITOS									
ELIPTOCITOS									
ESFEROCITOS			1						1
DACRIOCITOS									
ESQUIZOCITOS									
KERATOCITOS									
TOTAL			3	41	38	17	1		100

* Micras

TABLA.- XL

DIAMETRO Y MORFOLOGIA DE LOS ELEMENTOS PRESENTES EN EL ENFERMO N° 2
EN SITUACION CON OXIGENO (G - II).

MORFOLOGIA	DIAMETROS*								TOTAL
	4.5	5	5.5	6	6.5	7	7.5	8	
DISCOCITOS			2	42	13	11			68
TOROCITOS				4	4				8
CODOCITOS			1	1					2
ESTOMATOCITOS				6	4	1	1		12
LEPTOCITOS					1				1
ESFEROESTOMATOCITOS									
KINIZOCITOS			2	3	3				8
ELIPTOCITOS									
ESFEROCITOS									
DACRIOCITOS									
ESQUIZOCITOS	1								1
KERATOCITOS									
TOTAL	1		5	56	25	12	1		100

* Micras

TABLA.- XLI

DIAMETRO Y MORFOLOGIA DE LOS ELEMENTOS PRESENTES EN EL ENFERMO N.º 3
EN SITUACION CON OXIGENO (G - II).

MORFOLOGIA	DIAMETROS*							TOTAL	
	4.5	5	5.5	6	6.5	7.5	8		
DISCOCITOS			1	34	30	13	1	1	80
TOROCITOS									
CODOCITOS				3	2				5
ESTOMATOCITOS				3	3	1			7
LEPTOCITOS									
ESFEROESTOMATOCITOS				1		1			2
KINIZOCITOS			2	1	1				4
ELIPTOCITOS									
ESFEROCITOS									
DACRIOCITOS									
ESQUIZOCITOS			1						
KERATOCITOS			1						
TOTAL			5	42	36	15	1	1	100

* Micras

TABLA.- XLII

MORFOLOGIA	DIAMETROS*								TOTAL
	4.5	5	5.5	6	6.5	7	7.5	8	
DISCOCITOS				18	30	13	6	6	73
TOROCITOS									
CODOCITOS				2	1				3
ESTOMATOCITOS				2	6	4			12
LEPTOCITOS									
ESFEROESTOMATOCITOS				3	1				4
KINIZOCITOS			1	3	1	3			8
ELIPTOCITOS									
ESFEROCITOS									
DACRIOCITOS									
ESQUIZOCITOS									
KERATOCITOS									
TOTAL			1	28	39	20	6	6	100

* Micras

TABLA.- XLIII

DIAMETRO Y MORFOLOGIA DE LOS ELEMENTOS PRESENTES EN EL ENFERMO N° 5
EN SITUACION CON OXIGENO (G - II).

MORFOLOGIA	DIAMETROS*								TOTAL
	4.5	5	5.5	6	6.5	7	7.5	8	
DISCOCITOS			7	41	20	5	1		74
TOROCITOS									
CODOCITOS			1	4	1				6
ESTOMATOCITOS			7	3					10
LEPTOCITOS									
ESFEROESTOMATOCITOS		1	2						3
KINIZOCITOS			2	5					7
ELIPTOCITOS									
ESFEROCITOS									
DACRIOCIOS									
ESQUIZOCITOS									
KERATOCITOS									
TOTAL		1	19	53	21	5	1		100

* Micras

TABLA.- XLIV

DIAMETRO Y MORFOLOGIA DE LOS ELEMENTOS PRESENTES EN EL ENFERMO N° 6
EN SITUACION CON OXIGENO (G - II).

MORFOLOGIA	DIAMETROS*								TOTAL
	4.5	5	5.5	6	6.5	7	7.5	8	
DISCOCITOS			3	42	20	3			68
TOROCITOS									
CODOCITOS			2	3					5
ESTOMATOCITOS			4	6	3				13
LEPTOCITOS									
ESFEROESTOMATOCITOS				5					5
KINIZOCITOS			1	7					8
E.LIPTOCITOS									
ESFEROCITOS			1						1
LACRIOCITOS									
DISQUIZOCITOS									
ACERATOCITOS									
TOTAL			11	63	23	3			100

* Micras

TABLA.- XLV

DIAMETRO Y MORFOLOGIA DE LOS ELEMENTOS PRESENTES EN EL ENFERMO N° 7
EN SITUACION CON OXIGENO (G - II).

MORFOLOGIA	DIAMETROS*								TOTAL
	4.5	5	5.5	6	6.5	7	7.5	8	
DISCOCITOS			2	41	24	3			70
TOROCITOS					1				1
CODOCITOS			1	3					4
ESTOMATOCITOS			3	10					13
LEPTOCITOS									
ESFEROESTOMATOCITOS			2	2					4
KINIZOCITOS			2	2	2				6
ELIPTOCITOS									
ESFEROCITOS									
DACRIOCIOS									
ESQUIZOCITOS		1							1
KERATOCITOS		1							1
TOTAL		2	10	58	27	3			100

* Micras

TABLA.- XLVI

DIAMETRO Y MORFOLOGIA DE LOS ELEMENTOS PRESENTES EN EL ENFERMO N° 1
EN SITUACION CON ALOPURINOL (G - III).

MORFOLOGIA	DIAMETROS*							TOTAL	
	4.5	5	5.5	6	6.5	7	7.5		8
DISCOCITOS				12	14	27	2		55
TOROCITOS									
CODOCITOS				4	1				5
ESTOMATOCITOS				2	8	5			15
LEPTOCITOS									
ESFEROESTOMATOCITOS				6	1				7
KINIZOCITOS				3	1				4
ELIPTOCITOS					2	1			3
ESFEROCITOS			3	3					6
DACRIOCITOS									
ESQUIZOCITOS		1	1		3				5
KERATOCITOS									
TOTAL		1	4	30	30	33	2		100

* Micras

TABLA.- XLVII

DIAMETRO Y MORFOLOGIA DE LOS ELEMENTOS PRESENTES EN EL ENFERMO N° 2 EN SITUACION CON ALOPURINOL (G - III).									
MORFOLOGIA	DIAMETROS*								TOTAL
	4.5	5	5.5	6	6.5	7	7.5	8	
DISCOCITOS			2	37	11	10			60
TOROCITOS				4		1			5
CODOCITOS				3	1				4
ESTOMATOCITOS			2	10	2	2			16
LEPTOCITOS									
ESFEROESTOMATOCITOS				5	1				6
KINIZOCITOS			1	2		1			4
ELIPTOCITOS									
ESFEROCITOS									
DACRIOCITOS				1	1				2
ESQUIZOCITOS		1	1	1					3
KERATOCITOS									
TOTAL		1	7	63	14	15			100

* Micras

TABLA.- XLVIII

DIAMETRO Y MORFOLOGIA DE LOS ELEMENTOS PRESENTES EN EL ENFERMO N° 3 EN SITUACION CON ALOPURINOL (G - III).									
MORFOLOGIA	DIAMETROS*								TOTAL
	4.5	5	5.5	6	6.5	7	7.5	8	
DISCOCITOS			1	42	11	9			63
TOROCITOS		1		1	1				3
CODOCITOS			1	2	1				4
ESTOMATOCITOS			2	6	2	2			12
LEPTOCITOS									
ESFEROESTOMATOCITOS			1	3	1				5
KINIZOCITOS		1	3	2		1			7
ELIPTOCITOS					1				1
ESFEROCITOS		1							1
DACRIOCITOS									
ESQUIZOCITOS			3						3
KERATOCITOS		1							
TOTAL		4	11	56	17	12			100

* Micras

TABLA.- IL

DIAMETRO Y MORFOLOGIA DE LOS ELEMENTOS PRESENTES EN EL ENFERMO N° 4 EN SITUACION CON ALOPURINOL (G - III).								
MORFOLOGIA	DIAMETROS*							TOTAL
	4.5	5	5.5	6	6.5	7	7.5	
DISCOCITOS			1	25	20	12	6	64
TOROCITOS				2				2
CODOCITOS				3	3			6
ESTOMATOCITOS				8	4	2		14
LEPTOCITOS								
ESFEROESTOMATOCITOS			1	1	2			4
KINIZOCITOS			1	2	2			5
ELIPTOCITOS					1			1
ESFEROCITOS								
DACRIOCITOS								
ESQUIZOCITOS				2	1			3
KERATOCITOS				1				1
TOTAL			3	44	33	14	6	100

* Micras

TABLA.- L

DIAMETRO Y MORFOLOGIA DE LOS ELEMENTOS PRESENTES EN EL ENFERMO N° 5
EN SITUACION CON ALOPURINOL (G - III).

MORFOLOGIA	DIAMETROS*							TOTAL	
	4.5	5	5.5	6	6.5	7	7.5		8
DISCOCITOS			2	45	19	2			68
TOROCITOS									
CODOCITOS				3	2				5
ESTOMATOCITOS			3	10					13
LEPTOCITOS									
ESFEROESTOMATOCITOS			4	2					6
KINIZOCITOS				2					2
ELIPTOCITOS							1		1
ESFEROCITOS		1	2						3
DACRIOCIOS									
ESQUIZOCITOS			1		1				2
KERATOCITOS									
TOTAL		1	12	62	22	2	1		100

* Micras

TABLA.- LI

DIAMETRO Y MORFOLOGIA DE LOS ELEMENTOS PRESENTES EN EL ENFERMO N° 6 EN SITUACION CON ALOPURINOL (G - III).									
MORFOLOGIA	DIAMETROS*								TOTAL
	4.5	5	5.5	6	6.5	7	7.5	8	
DISCOCITOS				36	22	5	1		64
TOROCITOS									
CODOCITOS			1	3	2				6
ESTOMATOCITOS			2	17	1				20
LEPTOCITOS									
ESFEROESTOMATOCITOS			3	3					6
KINIZOCITOS		1	1	2					4
ELIPTOCITOS									
ESFEROCITOS									
DACRIOCIOS									
ESQUIZOCITOS									
KERATOCITOS									
TOTAL		1	7	61	25	5	1		100

* Micras

TABLA.- LII

DIAMETRO Y MORFOLOGIA DE LOS ELEMENTOS PRESENTES EN EL ENFERMO N° 7 EN SITUACION CON ALOPURINOL (G - III).									
MORFOLOGIA	DIAMETROS*								TOTAL
	4.5	5	5.5	6	6.5	7	7.5	8	
DISCOCITOS				44	22	4			70
TOROCITOS									
CODOCITOS				3					3
ESTOMATOCITOS			4	6	2				12
LEPTOCITOS					1	1	1		3
ESFEROESTOMATOCITOS			2	2	1				5
KINIZOCITOS			1	3	1				5
ELIPTOCITOS									
ESFEROCITOS			1	1					2
DACRIOCITOS									
ESQUIZOCITOS									
KERATOCITOS									
TOTAL			8	59	27	5	1		100

* Micras

TABLA .- LIII

DIAMETRO MEDIO Y DESVIACION STANDARD DE LOS DISCOCITOS EN CADA UNO DE LOS PACIENTES EN LAS TRES SITUACIONES EN ESTUDIO (G-I, G-II, G-III).						
CASO N°	G - I		G - II		G - III	
	\bar{X}	D.E.	\bar{X}	D.E.	\bar{X}	D.E.
1°	6.763	0.507	6.360	0.399	6.672	0.432
2°	6.322	0.401	6.242	0.400	6.241	0.406
3°	6.177	0.356	6.387	0.435	6.222	0.378
4°	6.455	0.437	6.671	0.590	6.476	0.507
5°	6.148	0.451	6.175	0.400	6.154	0.289
6°	6.070	0.364	6.169	0.318	6.273	0.355
7°	6.516	0.344	6.200	0.311	6.214	0.301

TABLA.- LIV

DIAMETRO MEDIO Y DESVIACION STANDARD DE LOS TOROCITOS EN CADA UNO DE LOS PACIENTES EN LAS TRES SITUACIONES EN ESTUDIO (G-I, G-II, G-III).

CASO N°	G - I		G - II		G - III	
	\bar{X}	D.E.	\bar{X}	D.E.	\bar{X}	D.E.
1°			6.500	0.353		
2°	6.250	0.353	6.250	0.267	6.200	0.447
3°	6.000	-			5.833	0.763
4°	6.166	0.288			6.000	-
5°						
6°						
7°	6.333	0.577	6.500	-		

TABLA.- LV

DIAMETRO MEDIO Y DESVIACION STANDARD DE LOS CODOCITOS EN CADA UNO DE LOS PACIENTES EN LAS TRES SITUACIONES EN ESTUDIO (G-I, G-II, G-III).

CASO Nº	G - I		G - II		G - III	
	\bar{X}	D.E.	\bar{X}	D.E.	\bar{X}	D.E.
1º	-	-	6.500	0.288	6.100	0.223
2º	6.333	0.577	5.750	0.353	6.125	0.250
3º	5.800	0.447	6.200	0.273	6.000	0.408
4º	6.200	0.447	6.166	0.288	6.250	0.273
5º	6.100	0.316	6.000	0.316	6.200	0.273
6º	5.875	0.250	5.800	0.273	6.083	0.376
7º	6.333	0.353	5.875	0.250	6.000	0.000

TABLA.- LVI

DIAMETRO MEDIO Y DESVIACION STANDARD DE LOS ESTOMATOCITOS EN CADA UNO DE LOS PACIENTES EN LAS TRES SITUACIONES EN ESTUDIO (G-I,G-II,G-III).

CASO N°	G - I		G - II		G - III	
	\bar{X}	D.E.	\bar{X}	D.E.	\bar{X}	D.E.
1°	6.380	0.522	6.323	0.430	6.600	0.338
2°	6.137	0.398	6.375	0.482	6.125	0.428
3°	5.916	0.257	6.357	0.377	6.166	0.492
4°	6.233	0.365	6.583	0.358	6.285	0.377
5°	6.145	0.345	5.650	0.241	5.884	0.219
6°	5.650	0.233	5.961	0.379	5.975	0.197
7°	6.233	0.495	5.884	0.219	5.916	0.358

TABLA.- LVII

DIAMETRO MEDIO Y DESVIACION STANDARD DE LOS LEPTOCITOS EN CADA UNO DE LOS PACIENTES EN LAS TRES SITUACIONES EN ESTUDIO (G-I, G-II, G-III).

CASO N°	G - I		G - II		G - III	
	\bar{X}	D.E.	\bar{X}	D.E.	\bar{X}	D.E.
1°	-	-	-	-	-	-
2°	-	-	6.500	0.000	-	-
3°	-	-	-	-	-	-
4°	-	-	-	-	-	-
5°	-	-	-	-	-	-
6°	-	-	-	-	-	-
7°	6.900	0.741	-	-	7.000	0.500

TABLA.- LVIII

DIAMETRO MEDIO Y DESVIACION STANDARD DE LOS ESFEROESTOMATOCITOS EN CADA UNO DE LOS PACIENTES EN LAS TRES SITUACIONES EN ESTUDIO (G-I, G-II, G-III).

CASO N°	G - I		G - II		G - III	
	\bar{X}	D.E.	\bar{X}	D.E.	\bar{X}	D.E.
1°	6.083	0.194	6.200	0.570	6.071	0.188
2°	5.937	0.320	-	-	6.166	0.408
3°	5.916	0.194	6.500	0.707	6.000	0.353
4°	6.187	0.250	6.125	0.250	6.125	0.478
5°	6.055	0.300	5.333	0.288	5.666	0.258
6°	5.444	0.166	6.000	0.000	5.750	0.273
7°	6.000	0.000	5.750	0.288	5.900	0.418

TABLA.- LIX

CASO N°	G - I		G - II		G - III	
	\bar{X}	D.E.	\bar{X}	D.E.	\bar{X}	D.E.
	1°	6.000	0.000	-	-	6.125
2°	6.000	0.223	6.062	0.417	6.125	0.629
3°	5.833	0.288	5.875	0.478	5.785	0.636
4°	6.200	0.447	6.375	0.582	6.100	0.418
5°	5.500	0.000	5.857	0.243	6.000	0.000
6°	5.833	0.258	5.937	0.176	5.625	0.478
7°	5.800	0.273	6.000	0.447	6.000	0.353

TABLA.- LX

CASO N°	G - I		G - II		G - III	
	\bar{X}	D.E.	\bar{X}	D.E.	\bar{X}	D.E.
	1°	6.000	-	-	-	6.660
2°	-	-	-	-	-	-
3°	-	-	-	-	-	-
4°	-	-	-	-	6.500	0.000
5°	-	-	-	-	7.500	0.000
6°	-	-	-	-	-	-
7°	-	-	-	-	-	-

TABLA.- LXI

CASO N°	G - I		G - II		G - III	
	\bar{X}	D.E.	\bar{X}	D.E.	\bar{X}	D.E.
1°	5.900	0.223	5.500	0.000	5.750	0.273
2°	5.500	0.000	-	-	5.000	0.000
3°	5.500	0.000	-	-	5.000	0.000
4°	5.750	0.353	-	-	-	-
5°	-	-	-	-	5.333	0.288
6°	5.000	0.000	5.500	-	-	-
7°	-	-	-	-	5.750	0.353

TABLA.- LXII

DIAMETRO MEDIO Y DESVIACION STANDARD DE LOS DACRIOCITOS EN CADA UNO DE LOS PACIENTES EN LAS TRES SITUACIONES EN ESTUDIO (G-I,G-II,G-III).

CASO N°	G - I		G - II		G - III	
	\bar{X}	D.E.	\bar{X}	D.E.	\bar{X}	D.E.
1º	-	-	-	-	-	-
2º	-	-	-	-	5.750	0.353
3º	-	-	-	-	-	-
4º	-	-	-	-	-	-
5º	6.000	0.000	-	-	-	-
6º	-	-	-	-	-	-
7º	-	-	-	-	-	-

TABLA.- LXIII

CASO Nº	G - I		G - II		G - III	
	\bar{X}	D.E.	\bar{X}	D.E.	\bar{X}	D.E.
1º	6.200	0.570	-	-	6.000	0.707
2º	5.000	0.000	4.500	0.000	5.500	0.500
3º	5.000	0.000	5.500	0.000	5.500	0.000
4º	5.500	0.707	-	-	6.166	0.288
5º	6.000	0.000	-	-	6.000	0.707
6º	-	-	-	-	-	-
7º	5.000	0.000	5.000	0.000	-	-

TABLA.- LXIV

DIAMETRO MEDIO Y DESVIACION STANDARD DE LOS KERATOCITOS EN CADA UNO DE LOS PACIENTES EN LAS TRES SITUACIONES EN ESTUDIO (G-I,G-II,G-III).

CASO N°	G - I		G - II		G - III	
	\bar{X}	D.E.	\bar{X}	D.E.	\bar{X}	D.E.
1°	-	-	-	-	-	-
2°	-	-	-	-	-	-
3°	-	-	5.500	0.000	5.000	0.000
4°	-	-	-	-	6.000	0.000
5°	-	-	-	-	-	-
6°	-	-	-	-	-	-
7°	-	-	5.000	0.000	-	-

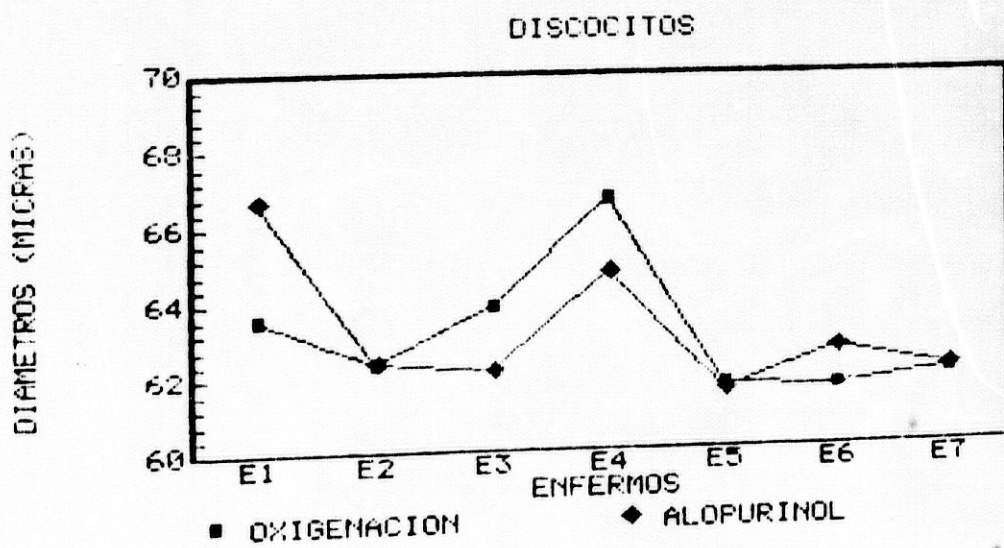
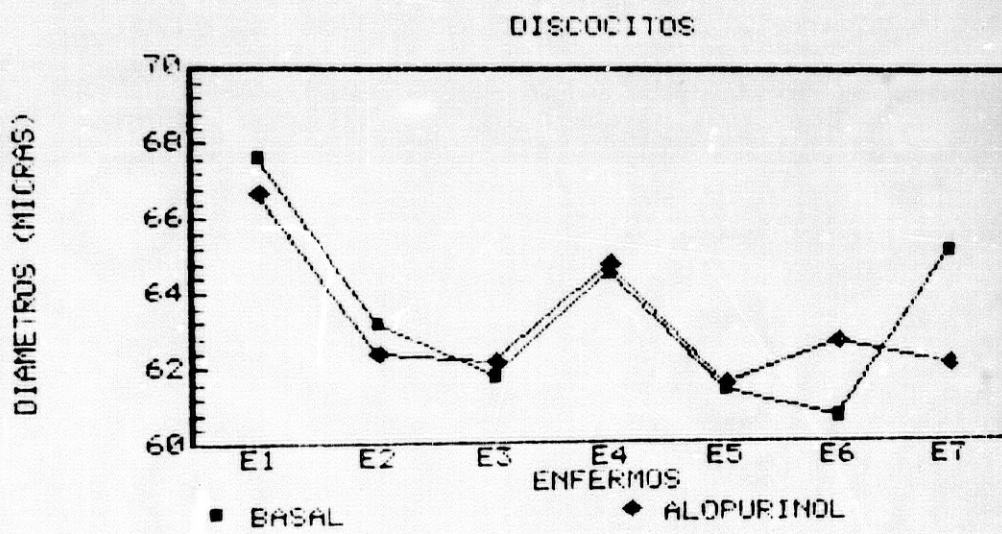
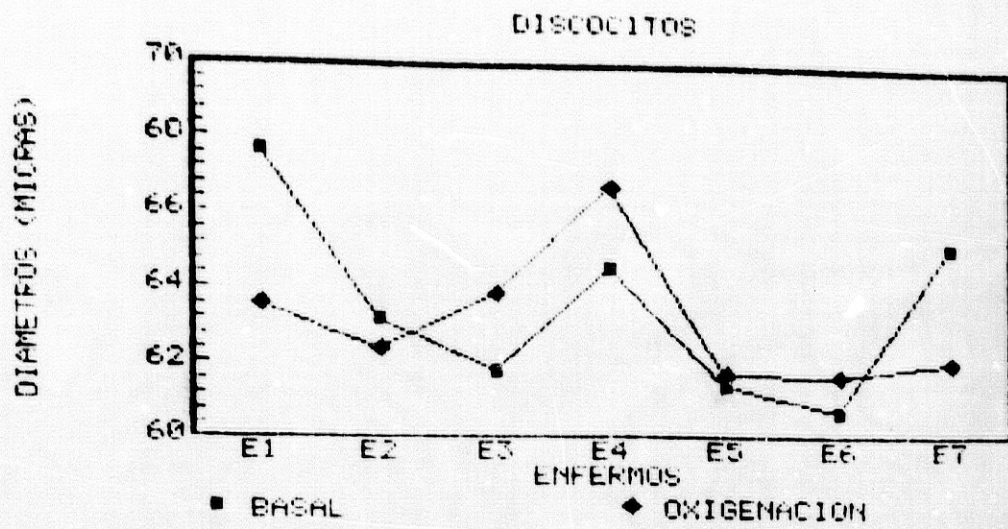


FIGURA 13.

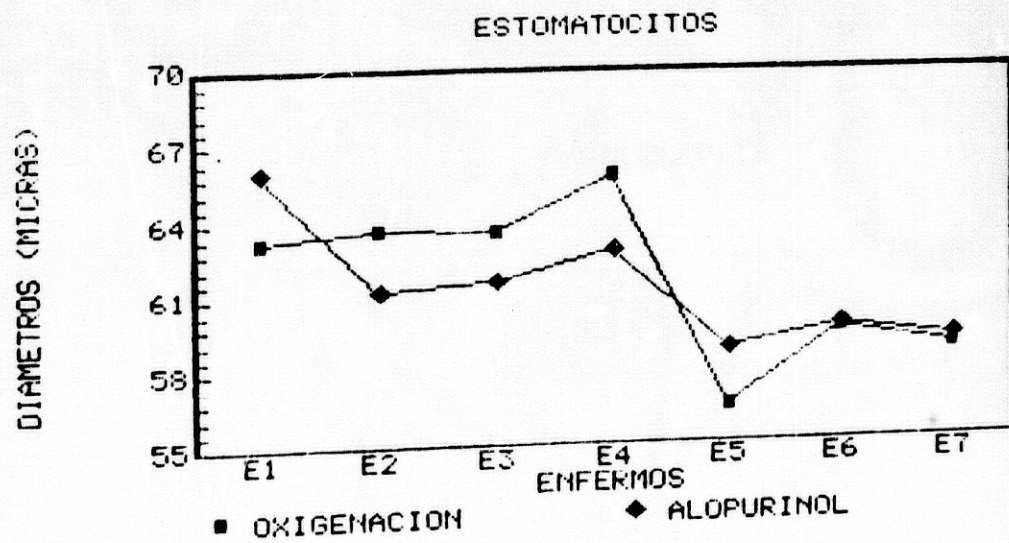
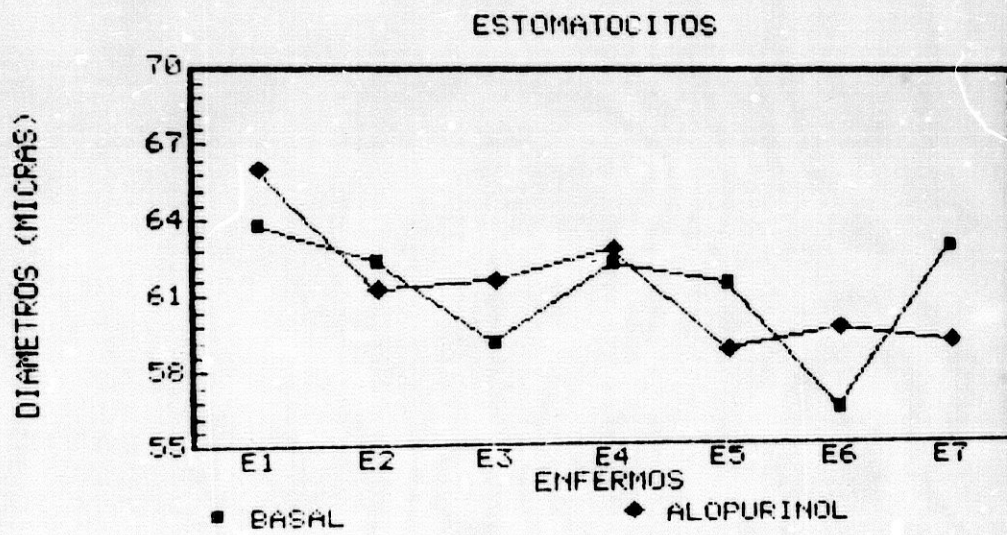
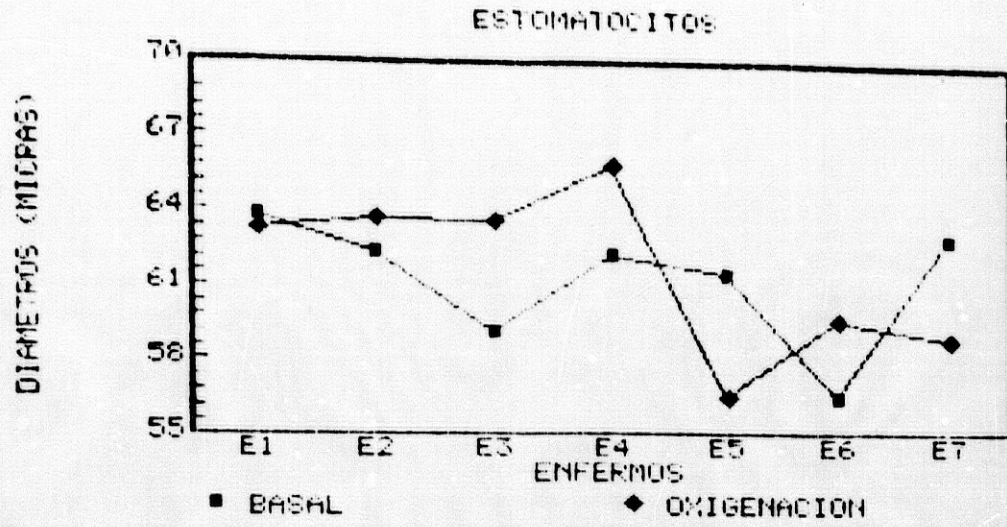


FIGURA 14.

TABLA .- LXV

DIAMETRO MEDIO Y DESVIACIONES STANDARD DE LOS TIPOS ERITROCITICOS EN LAS TRES SITUACIONES EN ESTUDIO.

	G - I		G - II		G - III	
	x	D.E.	x	D.E.	x	D.E.
DISCOCITOS	6.353	0.468	6.317	0.494	6.312	0.416
ESTOMATOCITOS	6.089	0.436	6.166	0.467	6.137	0.411
ESFEROESTOMAT.	5.941	0.320	5.978	0.464	5.948	0.358
KINIZOCITOS	5.937	0.304	6.036	0.424	5.999	0.500
CODOCITOS	6.124	0.403	6.093	0.368	6.121	0.280
TOROCITOS	6.222	0.363	6.388	0.323	6.050	0.497
ESQUIZOCITOS	5.727	0.684	5.000	0.500	5.843	0.539
ESFEROCITOS	5.700	0.349	5.500	0.000	5.583	0.358

TABLA .- LXVI

RESULTADOS DEL ANALISIS COMPARADO DE LOS DIAMETROS MEDIOS DE LAS FORMAS ERITROCITICAS EN LAS TRES SITUACIONES ESTUDIADAS MEDIANTE LA t-STUDENT

	<u>G-I / G-II</u>	<u>G-I / G-III</u>	<u>G-II / G-III</u>
DISCOCITOS	NS	NS	NS
ESTOMATOCITOS	NS	NS	NS
ESFEROESTOMAT.	NS	NS	NS
KINIZOCITOS	NS	NS	NS
CODOCITOS	NS	NS	NS
TOROCITOS	NS	NS	NS
ESQUIZOCITOS	NS	NS	0.023*
ESFEROCITOS	NS	NS	NS

* $p < 0.05$

6.- Estudio de Correlación:

Los resultados hasta ahora expuestos constituyen analisis de variables concretas relativas a la gasometría, hematimetría, metabolismo purínico, nucleótidos eritrocíticos y morfología y morfometría eritrocitaria.

En el presente apartado expresamos la correlación existente para cada situación descrita entre los valores bioanalíticos - hemoglobina, hematocrito, número de hematíes, volumen corpuscular medio, hemoglobina corpuscular media y concentración hemoglobínica corpuscular media, ATP, ADP, AMP e IMP - y la media del diámetro de los tipos eritrocitarios más significativos. Dichos resultados se representan en las tablas LXVII, LXVIII y LXIX.

TABLA .- LXVII

ESTUDIO DE CORRELACION EN SITUACION SIN OXIGENO (G - I)

	D	Et	Est	Ki	C	T	Esq	Es
Hb	NS	0.167*	NS	NS	NS	NS	0.668*	NS
Hto	0.146**	0.232**	NS	NS	0.339*	NS	0.685*	NS
Hties	0.263**	0.301**	0.281*	NS	0.374*	NS	NS	NS
ATP	0.353**	0.446**	0.564**	NS	0.334*	NS	NS	0.783**
ADP	0.131*	0.279**	0.510**	NS	NS	NS	NS	NS
AMP	NS	0.176*	NS	NS	NS	NS	NS	NS
IMP	0.162**	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
VCM	0.209**	NS	NS	NS	NS	NS	0.647*	NS
HDM	0.260**	0.203**	NS	0.407*	NS	NS	NS	NS
CHDM	0.244**	0.230**	NS	0.368*	NS	NS	NS	NS

* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

TABLA .- LXVIII

ESTUDIO DE CORRELACION EN SITUACION CON OXIGENO (G - II)

	D	Et	Est	Ki	C	T	Esq	Es
Hb	NS	NS	NS	NS	0.410*	NS	NS	NS
Hto	NS	NS	NS	NS	0.373*	NS	NS	NS
Hties	0.107*	0.274*	NS	NS	NS	NS	0.999*	NS
ATP	0.115*	0.274*	NS	NS	0.352*	NS	NS	NS
ADP	0.168**	0.383**	NS	NS	0.642**	NS	NS	NS
AMP	0.996*	0.282**	NS	NS	NS	NS	NS	NS
IMP	0.162**	0.225*	NS	NS	NS	NS	NS	NS
VCM	0.129**	0.297**	NS	NS	0.395*	NS	NS	NS
HDM	0.120**	0.348**	NS	NS	0.378*	NS	NS	NS
CHDM	0.090*	0.364**	NS	NS	NS	NS	NS	NS

* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

TAB. A .- LXIX

ESTUDIO DE CORRELACION EN SITUACION CON ALOPURINOL (G - III)

	D	Et	Est	Ki	C	T	Esq	Es
Hb	0.171**	0.225*	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Hto	0.103*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Htie	NS	NS	0.334*	NS	NS	NS	NS	NS
ATP	0.221**	0.346**	0.396*	NS	NS	NS	NS	0.617*
ADP	0.297**	0.489**	0.344*	NS	NS	NS	NS	NS
AMP	0.112**	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
IMP	0.332**	0.474**	NS	NS	NS	NS	NS	NS
VOY	0.301**	0.338**	NS	NS	NS	NS	NS	NS
HDY	0.318**	0.421**	NS	NS	NS	NS	NS	NS
CHY	0.277**	0.430**	0.356*	NS	NS	NS	NS	NS

* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

DISCUSSION

La discusión de la presente tesis doctoral debe llevarse a cabo a dos niveles fundamentales: en primer lugar en relación con la metodología aplicada y en segundo lugar en relación con los planteamientos clínicos, metabólicos y celulares descritos en la introducción de la misma.

Por lo que se refiere a la metodología bioquímica utilizada para identificar y cuantificar los nucleótidos, nucleósidos y bases purínicas es importante señalar como afirma KEITH - 113 - en relación con la determinación del metabolismo eritrocitario que las mediciones de tales compuestos exige técnicas sumamente sensibles debido a los rápidos cambios que pueden tener lugar en la manipulación del material sanguíneo. En este sentido es por lo que a nuestro juicio debe propagarse la utilización de las técnicas de Cromatografía Líquida de

Alta Resolución. Dichas técnicas revisadas recientemente por ZAKARIA y BROWN - 213 - generan en sus aplicaciones hematológicas escasos artefactos como han demostrado entre otros autores WEBSTER y WHAUN - 201 -, BOULIEU y cols - 28 -, INGEBRETSEN y cols - 104 - y HARKNESS y cols - 93 -.

La utilización de EDTA o heparina como anticoagulante ha sido objeto de intenso debate en relación con la exacta determinación de compuestos metabólicos eritrocitarios (HARKNESS y cols - 93 -, WEBSTER y WHAUN - 201 -). A este respecto HARKNESS y cols - 93 - realizan un estudio comparado con Cromatografía Líquida de Alta Resolución tras emplear indistintamente EDTA o heparina en las mismas muestras. Comprueban que si bien con EDTA los valores alcanzados en los nucleótidos son más elevados y en los metabolitos purínicos - inosina, hipoxantina y xantina - más reducidos en relación con los valores alcanzados cuando se utiliza heparina, las cifras obtenidas en el primer caso resultan ser más heterogéneas. Es por ello por lo que hemos utilizado la heparina en nuestro material de estudio.

La metodología empleada para el estudio microscópico y morfométrico de los elementos eritrocíticos debe constituir, por otra parte, un capítulo fundamental de la presente discusión.

Los eritrocitos constituyen, en efecto, como han indicado diferentes autores elementos de difícil preparación para el Microscopio

Electrónico de Barrido al ser sumamente complejo mantener durante su preparación metodológica una estructura similar a su situación " in vivo " (BESSIS y MANDON - 24 -, BARNHART y cols - 11 -).

Al igual que en la metodología bioquímica el uso de los anticoagulantes ha sido objeto de especial atención. En general se acepta que los distintos anticoagulantes generan modificaciones artefactuales variables (ZIPURSKY y cols - 214 -, BARNHART y cols - 11 -, - 12 -, BESSIS y WEED - 25 -, BERGA y cols - 15 -, GREEMWALT y cols - 89 -, GARCIA y cols - 82 -, MACIAS - 132 -). Es por ello por lo que hemos optado por la fijación inmediata de las muestras en las tres situaciones que configuran nuestro protocolo.

La fijación que hemos utilizado ha sido glutaraldehído al 1.25 % cifra que postulan BERGA y cols - 15 - y que se inserta dentro del rango del 0.5 al 6.5 % que propugnan en sus estudios los distintos autores (BARNHART y cols - 12 -).

Los mejores resultados se obtienen alrededor del 1% observándose en concentraciones más elevadas un incremento en los elementos kinizocíticos (ZIPURSKI y cols - 214 -).

POLLIACK y cols - 158 - y SANDERS y cols - 172 - han llevado a cabo en células sanguíneas el proceso de fijación con carácter previo al proceso de adhesión al soporte. ALLEN y DEXTER - 4 - y GAMLIEL y POLLIACK - 80 - han efectuado, por el contrario, el proceso

de fijación con posterioridad al de adhesión. Dicha cuestión no es, en absoluto, un problema carente de significación biológica pues como han estudiado en nuestro laboratorio GARCIA y cols - 82 - del uso de una u otra variedad se derivan problemas de cuantificación y de evaluación bioestructural del elemento sanguíneo que pueden en mayor o menor medida incidir en los resultados. En este sentido deben asimismo destacarse los trabajos de DE HARVEN y cols - 50 -.

La utilización de la poli-L-lisina como adherente tras la fijación en suspensión constituye el método que hemos elegido para el desarrollo de nuestro trabajo. Dicha metodología descrita por MAZIA y cols - 135 -, - 136 -, resulta sumamente útil para los estudios de recuento y ha sido experimentada muy satisfactoriamente en nuestro Departamento (MACIAS y cols - 132 -, GARCIA y cols - 81 -, - 82 -).

La morfogénesis eritrocítica se ve muy afectada por el nivel de temperatura en el que se lleva a cabo la fijación. ZIPURSKY y cols - 214 - afirman, en este sentido, que las muestras mantenidas y fijadas a 37° C tienden a formar estructuras más cupuliformes que discoides. Las mantenidas y fijadas a 4° C no ofrecen como ha indicado BESSIS - 16 - modificaciones significativas. El mantenimiento de las muestras sanguíneas a esta temperatura sin fijación previa genera, sin embargo, importantes artefactos morfoestructurales (BESSIS - 16 -, DARDANO y KIMZEY - 47 -).

Es evidente por tanto que la pautas seguida se ha realizado de acuerdo con las indicaciones previamente reseñadas.

La utilización o no de tetróxido de osmio se justificaba para BESSIS y WEED - 25 - y WHITE - 204 - por el endurecimiento de las membranas celulares y prevención de la deformabilidad celular en el primer caso y por la generación de actefactos esferoidales en la superficie celular en el segundo (SHELTON y MOWCZKO - 185 -).

El empleo de la técnica de punto crítico de ANDERSON revisada recientemente por BOYDE y TAMARIN - 30 - ha resuelto, al menos parcialmente, estos problemas con lo que, como indican BARNHART y cols - 12 -, la osmificación no parece necesaria en el momento presente. Resulta obvio que en nuestro material hemos seguido los criterios metodológicos arriba indicados y que en consecuencia no se ha realizado la postfijación con tetróxido de osmio. Las muestras han sido, por supuesto, desecadas por el sistema del punto crítico.

Una vez discutidas las pautas metodológicas que hemos utilizado en las determinaciones bioquímicas y en la preparación de las muestras para la Microscopía Electrónica de Barrido debemos comenzar a discutir los resultados obtenidos en las distintas situaciones reflejadas en nuestro protocolo.

En este sentido comenzaremos señalando que las tres situa-

ciones analizadas se corresponden por una parte con una situación basal de hipoxemia arterial sistémica crónica y con dos situaciones de índole terapéutica: la oxigenoterapia cuya utilización posee una amplia base de justificación clínica (ANTHONISEN - 5 -, MITHOEFER - 143 -, MEDICAL RESEARCH COUNCIL WORKING PARTY - 140 -, NOCTURNAL OXYGEN THERAPY TRIAL GROUP - 148 -, FLENLEY - 69 -, PETTY y cols - 155 -, LOWSON y cols - 129 -) y la administración de alopurinol que se justificaria de acuerdo con lo establecido en la introducción de la presente tesis doctoral.

El análisis de los resultados gasométricos pone en efecto de relieve la existencia de diferencias significativas en los valores del pH, presión arterial de oxígeno (pO_2) y presión arterial de dióxido de carbono (pCO_2) en relación, obviamente, con la administración o no de oxígeno, independientemente de la administración de alopurinol. Es importante señalar, en cualquier caso, que la tendencia a la acidosis que suscita la administración de oxígeno es secundaria a la retención crónica de anhídrido carbónico (MITHOEFER - 143 -, PETTY y cols - 155 -).

Los resultados hematimétricos reflejan, por el contrario, que existen diferencias significativas en los valores del hematocrito, volumen corpuscular medio y concentración hemoglobínica corpuscular

media entre la situación basal y la administración tanto de oxígeno como de alopurinol; no objetivándose diferencias entre estos dos últimos grupos. Dichas variaciones que pueden originarse a partir de la alteración del volumen corpuscular medio deben, en consecuencia, relacionarse con la diferente tipología eritrocítica que posteriormente describiremos.

En relación con la determinación de metabolitos purínicos los resultados obtenidos permiten comprobar la existencia de diferencias significativas en los valores tanto en sangre como en orina de compuestos tales como el ácido úrico, hipoxantina y xantina cuando se administra el alopurinol con independencia del nivel de oxígeno. Es fácil comprobar de acuerdo con RUNDLES - 168 - que la inhibición de la xantina oxidasa condiciona la alteración de los citados metabolitos tanto en sangre como en orina (HITCHINS - 102 -, ELION - 59 -, FOX - 73 -, FOX y cols - 76 -, KELLEY y WYNGAARDEN - 114 -).

La inosina ofrece asimismo diferencias significativas entre el grupo de situación basal sin oxígeno y los otros dos grupos. Dichos resultados tienen a nuestro juicio un valor relativo pues la inosina al poseer como la adenosina una vida media sumamente breve y degradarse rápidamente (FOX y cols - 71 -, KLABUNDE - 118 -) no ha podido ser detectada en una tercera parte de las determinaciones efectuadas.

El estudio estadístico comparado de los metabolitos purínicos entre el grupo de situación basal sin oxígeno y el grupo al que se administra oxígeno pone de relieve la existencia de diferencias significativas respecto del ácido úrico. Este aparece en los tres grupos estudiados con valores decrecientes, es decir más elevados en el grupo sin oxígeno, disminuyendo en el grupo con oxígeno y alcanzando su mínimo nivel en el grupo con alopurinol.

La evaluación de los resultados arriba expuestos sugiere en primer lugar constatar un hecho evidente: entre la situación basal sin oxígeno y la situación con oxígeno sólo se aprecia una diferencia de la uricemia o lo que es lo mismo el incremento - en mayor medida en el grupo primero respecto del segundo - del metabolito final de la vía de degradación de los nucleótidos purínicos. No es posible afirmar si la no existencia de valores significativamente aumentados de los metabolitos precedentes - hipoxantina, xantina - tiene por base la continua producción y degradación de dichos metabolitos a lo largo del proceso metabólico o si la génesis de la hiperuricemia se desencadena a partir de otros factores (HARTER - 99 -, ISOMAKI y KREUS - 105 -, VALAT y cols - 195 -, KHOKHAR - 116 -, ALONSO GUTIERREZ y cols - 2 -, - 3 -, MORITA y cols - 145 -).

HASDAY y GRUM - 100 - han demostrado recientemente que en pacientes que desarrollan hipoxemia nocturna a causa del síndrome

de apnea del sueño existen cifras incrementadas de eliminación renal de ácido úrico sin que se objetive, al igual que en nuestro estudio, incremento en los metabolitos previos. LOPEZ y cols - 128 - han demostrado, por el contrario, que en pacientes con obstrucción crónica al flujo aéreo con grave situación de hipoxia no sólo existen cifras elevadas de ácido úrico sino que además es posible observar niveles urinarios elevados de los metabolitos precedentes al mismo.

Parece deducirse de este conjunto de trabajos una posible relación entre los niveles de producción, acumulación y degradación de los metabolitos de la vía de las purinas y los niveles de oxígeno que determinan la gravedad del proceso. Ello implica la necesidad de buscar la conexión metabólica adecuada entre la hipoxemia y la degradación de nucleótidos purínicos. La hemoglobina deoxigenada y el nivel de 2-3 difosfoglicerato pueden jugar un papel importante en el desarrollo de este proceso (BELLINGHAM y GRIMES - 14 -).

La determinación de nucleótidos intraeritrocíticos refleja por otra parte como dato más característico de nuestros resultados la ausencia de variaciones significativas en los niveles de ATP en los tres grupos estudiados lo que parece indicar que independientemente de la elevación del metabolito purínico final, la regulación de la síntesis y degradación de ATP permanece estable. Resultará, por tanto, imprescindible en el futuro investigar acerca de aquellos substratos

y vías metabólicas a partir de las cuales pueden mantenerse dichos niveles.

A nuestro juicio resulta básico en cualquier caso la reacción mediada por la enzima hipoxantina-guanina-fosforibosiltransferasa que, entre otras acciones, transforma la hipoxantina en IMP, haciendo posible la resíntesis del ATP eritrocitario (EDWARDS y cols - 58 -).

Si ello no ocurriera, como han sugerido YOSHINO y cols - 212 - en la hipoxia de las alturas, la posible degradación de nucleótidos purínicos intraeritrocitarios inducida por la hipoxemia conduciría mediante la activación de la AMPdeaminasa y de la 5 nucleotidasa, a la formación sucesiva de hipoxantina, xantina y ácido úrico y en consecuencia a la pérdida irrecuperable del nucleósido necesario para la resíntesis del ATP (Figura 15).

La administración independiente de oxígeno y de alopurinol podría, parece claro, favorecer aunque por diferentes vías como han indicado COHEN - 45 -, BELLINGHAM y GRIMES - 14 -, KELLEY y WYNGAARDEN - 114 -, EDWARDS y cols - 58 - la producción de compuestos altamente energéticos.

Las diferencias observadas en los nucleósidos IMP y AMP en relación con los grupos a los que se administra oxígeno y alopurinol ofrecen una explicación difícil si bien creemos que deben inscribirse en el contexto de regulación y equilibrio previamente expuesto. El

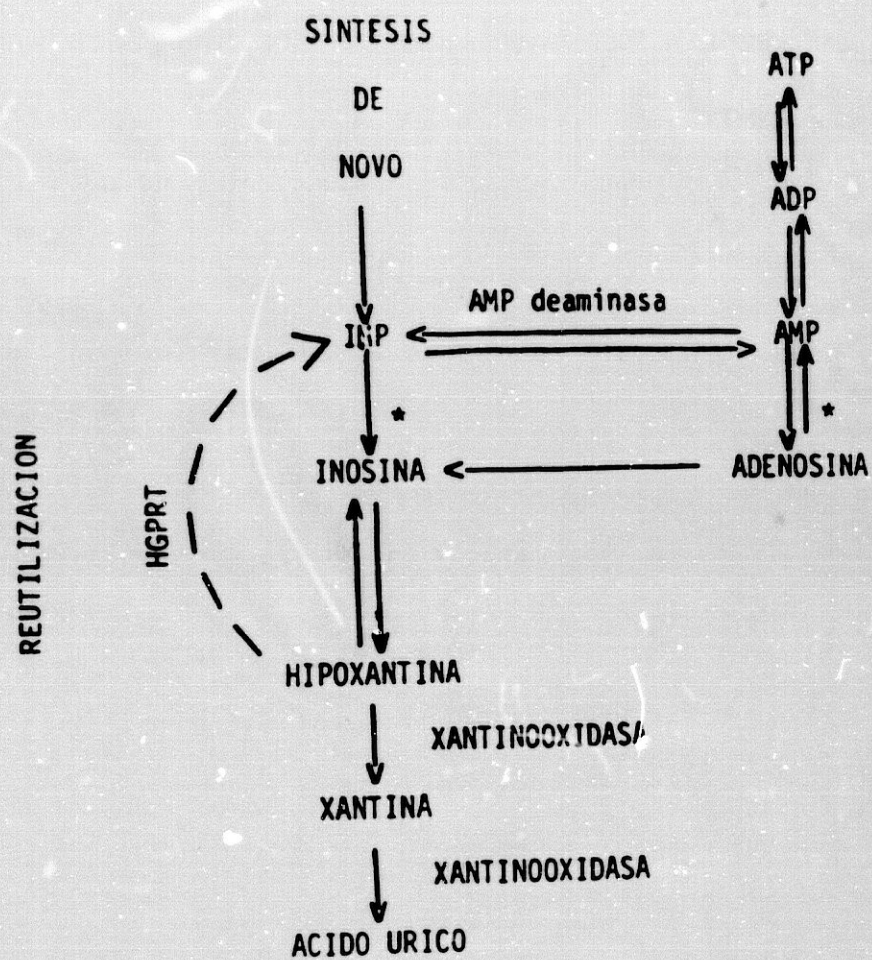


FIGURA 15

ESQUEMA SIMPLIFICADO DEL METABOLISMO DE LAS PURINAS

*: 5-Nucleotidasas

HGPRT: Hipoxantina guanina fosforibosil transferasa.

hecho de que los niveles de AMP e IMP sean significativamente más elevados en el grupo al que se administra alopurinol puede explicarse sin embargo a nuestro juicio a partir de la hipótesis antes reseñada ya que dicho compuesto potencia la vía de recuperación de nucleótidos purínicos.

Algunos de los datos bioquímicos discutidos se relacionaran posteriormente con la morfología y morfometría eritrocítica con las que en nuestra opinión y en la de otros autores pueden hallarse estrechamente relacionados (BIRCHMEIER y SINGER - 27 -, SHEETZ - 183 -).

Una vez discutidos los datos bioquímicos más relevantes es hora de evaluar los distintos caracteres morfológicos y morfométricos que en relación con los primeros permitan una interpretación de la biología celular eritrocítica en al hipoxemia arterial sistémica crónica de los pacientes con OCFA.

En relación con los tipos eritrocitarios cabe destacar que desde los trabajos iniciales de BESSIS - 17 -, - 18 -, con Microscopía Electrónica de Barrido el interés fundamental ha radicado básicamente en el análisis e interpretación de las distintas variedades morfoestructurales sin que dichos estudios llevaran a cabo, en general, una evaluación porcentual en los distintos procesos hematológicos.

En este sentido en los últimos años ha comenzado a investigarse no sólo la tipología eritrocítica sino la cuantificación de dichos tipos y la interpretación poblacional que ello supone (BUNYARAT-VEJ y cols - 38 -, ZIPURSKY y cols - 214 -, MACIAS - 130 -, MACIAS y cols - 131 -, GARCIA y cols - 81 -).

En nuestro trabajo un dato que a este respecto es sumamente destacable lo constituye la significativa diferencia estadística, en los tres grupos estudiados, de la distribución porcentual de los distintos elementos formes.

Resulta evidente por tanto que el mero análisis y recuento del sistema eritrocitario nos permitiría llevar a cabo una evaluación del proceso hipóxico. ¿Cuál es la interpretación biológica que justifica la existencia de unos u otros tipos eritrocíticos ?.

La respuesta no es obviamente fácil si bien estadísticamente nuestros resultados reflejan asimismo diferencias muy significativas entre los distintos grupos a nivel fundamentalmente de los discocitos, estomatocitos y esferoestomatocitos. En menor medida dichas diferencias se aprecian en lo que respecta a los esquizocitos y esferocitos.

Con carácter singular debe destacarse a nuestro juicio que los estomatocitos constituyen un elemento indicador de la situación basal sin oxígeno y que su disminución resulta ser sumamente signifi-

cativa en los grupos sometidos a tratamiento tanto con oxígeno como con alopurinol entre los cuales no existen, por lo que respecta a esta variedad eritrocítica, diferencias significativas. Dicha acción terapéutica, como se desprende de nuestros datos, se lleva a cabo a expensas de una transformación de estos elementos en discocitos ortotípicos. Estos datos deben relacionarse con las variaciones del volumen corpuscular medio que discutimos en un apartado precedente.

La interpretación citofisiológica de estas variaciones sólo será posible analizando los distintos factores que influyen sobre la morfología de las diferentes variedades eritrocíticas.

DARDANO y KIMZEY indican a este respecto que la forma eritrocítica constituye el indicador básico que expresa la relación homeostática entre la estructura eritrocitaria y los micromedioambientes intracelular y extracelular - 47 -.

En este sentido, como es clásicamente reconocido, el discocito constituye la variedad morfológica circulante que posee las propiedades biomecánicas más fluidas para adaptarse a la dinámica circulatoria (BARNHART y cols - 12 -). Se conforma en efecto como una estructura estable que proporciona el máximo área posible para su volumen, correspondiéndose, además, con el tipo eritrocítico de menor carga electrostática. BARNHART y cols - 9 -, - 10 -, han demostrado que estas características les otorgan una deformabilidad óptima que les permite

su circulación por órganos de arquitectura tan reticular como el bazo.

Las restantes formas eritrocíticas poseen, en general, una menor deformabilidad, por lo que es en esta propiedad donde radica la diferencia substancial del discocito con las demás variedades morfológicas. A pesar de que resulta obvio que de esta rigidez o pérdida de deformabilidad han de derivarse consecuencias patológicas importantes, se dispone de escasa información acerca de las bases bioquímicas que justifiquen dicha alteración. Las variaciones metodológicas propuestas por BULL y BRAILSFORD - 36 - y WHITE - 205 - han de aportar hallazgos notables en este campo con la Microscopía Electrónica de Barrido.

Desde los trabajos clásicos de PONDER - 159 -, en este sentido, se conoce que la adopción de una determinada forma por un elemento eritrocítico es debida, en gran medida, a modificaciones en la estructura de la membrana celular. El descubrimiento posterior por DEUTICKE - 52 - de que ciertas drogas - p. e. clorpromazina - originan transformaciones estomatocíticas y equinocíticas en relación con variaciones en la distribución espacial molecular y de cargas eléctricas de la membrana de los eritrocitos confirma la idea antes expuesta. Por otra parte se ha puesto de relieve la importancia de la organización en monocapas o bicapas acopiadas para explicar los cambios de forma debidos a interacciones químicas y/o eléctricas

(EVANS - 62 -, SHEETZ y SINGER - 184 -).

Un abordaje sumamente atrayente en este contexto es el realizado por BECK - 13 - mediante una aproximación geométrica a los datos obtenidos a través de la Microscopía Electrónica de Barrido considerando, como hemos indicado, que modificaciones en las monocapas de la membrana permiten interpretar los cambios de forma celulares. Calcula por ejemplo que en un discocito de $138 \mu\text{m}^2$ y $8 \mu\text{m}$ de diámetro la diferencia de área de las dos monocapas de la membrana sería del $0.41 \mu\text{m}^2$. La existencia de cambios tan pequeños como del orden de $+ 0.01$ ó $- 0.02 \mu\text{m}^2$ en la superficie de dichas monocapas haría que oscilaríamos entre un esferocito o un estomatocito. De este modo se podría originar la transformación de discocito en esferocito mediante la mera inserción de sustancias catiónicas en la monocapa más interna. Conviene no obstante señalar que la extrapolación de estos resultados desde modelos teóricos y experimentales a la complejidad de los seres vivos suscita amplias controversias.

La transformación discocito-estomatocito puesta de relieve en diversas situaciones patológicas (WEED y BESSIS - 202 -, MACIAS - 130 -) y fundamentalmente a nuestro juicio en la biología eritrocítica de las tres situaciones estudiadas creemos debe interpretarse desde las bases arriba expuestas.

En cualquier caso el estudio de la Estomatocitosis Hereditaria

está abriendo importantes caminos acerca de una mejor interpretación de la morfología estomatocítica. En este sentido WILEY y cols - 207 -, - 208 -, han podido demostrar que las variaciones en la concentración de las bombas de cationes de la membrana eritrocítica permiten explicar el incremento de ADP, la baja concentración de 2-3 difosfoglicerato, el aumento del contenido lipídico de la membrana y la mayor afinidad por el oxígeno que se presentan en este síndrome.

Si como hemos tenido ocasión de señalar previamente modificaciones catiónicas y lipídicas pueden generar variaciones morfológicas (BECK - 13 -) y si, por otra parte, la hipoxemia puede generar trastornos en la carga energética del hematíe (nucleótidos purínicos, 2-3 difosfoglicerato, ...) (YOSHINO y cols - 212 -, LOPEZ - 128 -, BELLINGHAM y GRIMES - 14 -), no debe resultar sorprendente que en la situación sin oxígeno, que requiere especial afinidad por el mismo por parte de los hematíes, la transformación estomatocítica sea significativa y reversible con la oxigenoterapia y con el alopurinol.

Un dato que no debemos olvidar en relación con la morfología eritrocítica es la influencia que, como hemos expuesto con anterioridad, poseen ciertas drogas en la génesis de la misma (WEED y BESSIS - 202 -, SCHRIER y JUNGER - 181 -, LIEBER y cols - 126 -, GREENWALT y cols - 89 -, GIGLIO y BOZZINI - 85 -, IGISU y MAWATARI - 103 -). Hemos de señalar que dichas drogas no han sido utilizadas en nuestro estudio.

La morfometría de las células eritrocíticas ha sido investigada por VOMEL - 198 - en relación con la morfología celular caracterizando a los elementos con diámetro menor de 7 micras como los más viejos del sistema.

LEBLOND y SHOUCRI - 123 - establecen, por otra parte que el diámetro promedio de los hematíes oscila en torno a 7.49 micras.

Al igual que GARCIA y cols - 81 - y MACIAS - 130 - en nuestro laboratorio los diámetros promedio que obtenemos en nuestro material no alcanzan dichas cifras. Las mediciones obtenidas en nuestro caso deben interpretarse en relación con el sistema de punto crítico utilizado en la metodología. Si como han demostrado COHEN - 43 -, COHEN y cols - 44 -, BOYDE - 29 - y DEBAULT - 49 - existe retracción de las muestras biológicas con este método la utilización sistemática del mismo debe permitir el establecimiento de imágenes, estructuras y diámetros equivalentes que en el sentir de LEBLOND y SHOUCRI - 123 - justificarían cualquier estudio en este campo.

Nuestros resultados en lo que a la morfometría atañe no ofrecen diferencias significativas entre los tres grupos a excepción de los referentes a los esquizocitos cuya interpretación debido a su escaso número no resulta relevante. Si constituye un motivo de especial interés por el contrario la correlación existente entre los diámetros de distintas variedades eritrocíticas tales como los

discocitos y estomatocitos con los resultados hematimétricos - número de hematies, hematocrito, volumen corpuscular medio, hemoglobina corpuscular media,... - y con los niveles de los nucleótidos intraeritrocitarios - ATP, ADP, AMP e IMP - lo que en última instancia refuerza la argumentación previamente expuesta que relaciona la forma y diámetro celulares con los requerimientos energéticos eritrocíticos y con su expresión analítica.

La identificación morfoestructural con Microscopía Electrónica de Barrido asociada a la investigación bioquímica eritrocitaria en distintos procesos clínicos y experimentales deberá permitir a nuestro juicio, en el futuro, una mejor comprensión de algunos de los interrogantes suscitados en la presente discusión.

CONCLUSIONES

1.- La utilización conjunta de la Microscopía Electrónica de Barrido (M.E.B.) para la determinación de la tipología y morfometría eritrocítica y de la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (H.P.L.C.) para la determinación de la bioquímica intraeritrocitaria permite evaluar, al establecer indicadores estructurales y metabólicos, la biología y biopatología del sistema eritrocítico en los pacientes con Obstrucción Crónica al Flujo Aéreo (O.C.F.A.) generando escasos resultados artefactuales.

2.- El estudio del metabolismo purínico en las tres situaciones analizadas en los pacientes con O.C.F.A. - grupo sin oxígeno, grupo con oxígeno, grupo con alopurinol - pone de relieve la existencia de diferencias significativas en la concentración sérica de uratos

si bien a nivel de los metabolitos previos - hipoxantina, xantina - sólo se han objetivado diferencias significativas cuando se administra alopurinol con independencia de la administración de oxígeno. Los niveles de uricemia, en cualquier caso, no son homogéneos en las tres situaciones estudiadas. La variabilidad establecida debe relacionarse con la influencia que sobre los mecanismos reguladores de la vía de los metabolitos purínicos poseen las dos variedades terapéuticas utilizadas.

3.- El estudio de los nucleótidos intraeritrocíticos en las tres situaciones analizadas en los pacientes con O.C.F.A. - grupo sin oxígeno, grupo con oxígeno, grupo con alopurinol - permite establecer que no existen diferencias significativas en los niveles intraeritrocitarios de ATP lo que, independientemente de las variaciones observadas en el metabolito purínico final, debe relacionarse en las tres situaciones estudiadas con los mecanismos que regulan la síntesis y degradación del ATP. La existencia de variaciones significativas en los niveles de AMP e IMP entre los grupos a los que se administra oxígeno o alopurinol pone de relieve la singularidad que sobre el sistema de regulación energética ejercen ambas situaciones terapéuticas.

4.- El estudio con M.E.B. de la citología eritrocítica en las tres situaciones analizadas en los pacientes con O.C.F.A.

- grupo sin oxígeno, grupo con oxígeno, grupo con alopurinol - permite establecer una distribución, estadísticamente significativa, de los distintos elementos eritrocitarios entre cada una de dichas situaciones. Las diferencias fundamentales atañen a los discocitos, estomatocitos y esferoestomatocitos y en menor grado a los esquizocitos y esferocitos. El estudio morfométrico de los elementos eritrocíticos no revela, por el contrario, diferencias significativas en las tres situaciones estudiadas.

5.- El estudio con M.E.B. de la citología eritrocítica en las tres situaciones analizadas en los pacientes con O.C.F.A. - grupo sin oxígeno, grupo con oxígeno, grupo con alopurinol - permite establecer que el estomatocito constituye el indicador eritrocítico de la situación sin oxígeno. Dicho elemento disminuye significativamente con las dos variedades terapéuticas aplicadas sin que exista diferencia en la reducción originada a partir de la administración de oxígeno o de alopurinol. La transformación estomatocito-discocito puede postularse, básicamente, como eje de la acción de ambas variedades terapéuticas y evaluarse hematimétricamente mediante las variaciones del volumen corpuscular medio que ofrece diferencias significativas en nuestro estudio entre el grupo sin oxígeno y los grupos sometidos a tratamiento.

6.- El estudio de la hematimetría, de los nucleótidos purí-

nicos intraeritrocitarios con H.P.L.C. y de la citología eritrocítica con M.E.B. en las tres situaciones analizadas en los pacientes con O.C.F.A. - grupo sin oxígeno, grupo con oxígeno, grupo con alopurinol - permite postular una correlación directa entre el diámetro celular de los discocitos y estomatocitos fundamentalmente con los niveles de ATP y ADP intraeritrocíticos y con diversos índices hematimétricos. Dicha correlación debe inscribirse en la biopatología eritrocitaria de la Hipoxemia Arterial Sistémica Crónica de los pacientes con O.C.F.A..

7.- El estudio conjunto hematimétrico, de los metabolitos purínicos, de los nucleótidos intraeritrocitarios con H.P.L.C. y de la morfología y morfometría eritrocítica con M.E.B. pueden contribuir, desde las conclusiones antes expuestas, a la evaluación del diagnóstico, pronóstico y tratamiento de la Hipoxemia Arterial Sistémica Crónica en la Obstrucción Crónica al Flujo Aéreo.

BIBLIOGRAFIA

1.- ACKERMAN G. A., GRASSO J. A. y KNOUFF R. A.. Erythropoiesis in the mammalian embryonic liver as revealed by electron microscopy. Lab Invest 1.961; 10: 787-796.

2.- ALONSO D., ARRIBA G., MATEOS A., PASCUAL F. y PORTUGAL J.. Elevación de la uricemia en los pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Rev Esp Reumatol 1.983; 10: 6-7.

3.- ALONSO D., ARRIBA G., CORDERO M., SANCHEZ P. y GUTIERREZ J. L.. Excreción renal de ácido úrico en la broncopatía crónica. Rev Esp Reumatol 1.983; 10: 95-99.

4.- ALLEN T. D. y DEXTER T. M.. Surface morphology and ultrastructure of murine granulocytes and monocytes in long-term liquid culture.

Blood Cells 1.976; 2: 591-606.

5.- ANTHONISEN N. R.. Hypoxemia and O₂ therapy. Am Rev Respir Dis 1.982; 126: 729-733.

6.- ANTHONISEN N. R.. Home Oxygen Therapy. En: Petersdorf R. G., Adams R. D., Braunwald E., Isselbacher K. J., Martin J. B. y Wilson J. D. eds. New treatment modalities. Update VI: Harrison's Principles of Internal Medicine. New York. McGraw-Hill. 1.985: 203-213.

7.- BAKER G. F. y ROGERS H. J.. Further effects of chlorpromazine on the hexose permeability of the human erythrocyte. J Physiol 1.973; 232: 597-608.

8.- BALCERZAK S. P. y BROMBERG P. A.. Secondary Polycythemia. Semin Hematol 1.975; 12: 353-382.

9.- BARNHART M. I. y LUSHER J. M.. The human spleen as revealed by scanning electron microscopy. Amer J Hematol 1.976; 1: 243-264.

10.- BARNHART M. I. y LUSHER J. M.. Structural physiology of the human spleen. Am J Ped Hematol/Oncol 1.979; 1: 311-330.

11.- BARNHART M. I., WALLACE F. A. y LUSHER J. M.. Erythrocyte membrane dynamics in hereditary spherocytosis. Scan Electron Microsc 1.978; II: 497-510.

12.- BARNHART M. I., WALLACE M. A. y LUSHER J. M.. Red Blood Cells.

En Hodges B. M. y Carr K. E., eds. Biomedical Research Applications of Scanning Electron Microscopy. Londres, Academic Press. 1.983; vol. 3: 171-243.

13.- BECK J. J.. Relations between membrane monolayers in some red cell shape transformations. J Theor Biol 1.978; 75: 487-501.

14.- BELLINGHAM A. J. y GRIMES A. J.. Red cell 2,3-diphosphoglycerate. Br J Haematol 1.973; 25: 555-562.

15.- BERGA L., VIVES-CORRONS J. L., FERRAN M. J., ROZMAN C., AGUILAR J. L., JOU J., FELIU E., ESTER A. y DOLZ J.. Contribució de la Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) al estudio de la morfología eritrocitaria y al diagnóstico de los síndromes hemolíticos. Sangre 1.982; 4: 445-460.

16.- BESSIS M.. Les erythrocytes crénelés. Nouv Rev Franç Hématol 1.970; 10: 5-8.

17.- BESSIS M.. Red Cell Shapes. An illustrated classification and its rationale. Nouv Rev Franç Hématol 1.972; 12: 721-746.

18.- BESSIS M.. Red Cell Shapes. An illustrated classification and its rationale. En Bessis M., Weed R. I. y Leblond P. F., eds. Red Cell Shapes. New York, Springer Verlag. 1.973: 180-198.

19.- BESSIS M. y DE BOISFLEURY A.. Etude sur les poikilocytes au microscope à balayage. En particulier dans la thalassémie. Nouv Rev

Franç Hématol 1.970; 10: 515-534.

20.- BESSIS M. y BRECHER G.. Action du plasma conservé sur la forme des globules rouges (transformation discocyte-échinocyte). Nouv Rev Franç Hématol 1.971; 11: 305-308.

21.- BESSIS M. y BRETON-GORIUS J.. Le reticulocyte colorations vitales et microscope électronique. Nouv Rev Franç Hématol 1.964; 4: 77-82.

22.- BESSIS M. y JENSEN W. N.. Sideroblastic anaemia, mitochondria and erythroblastic iron. Br J Hemat 1.965; II: 49-55.

23.- BESSIS M. y LESSIN L.. The discocyte-echinocyte equilibrium of the normal and pathologic red cell. Blood 1.970; 36: 399-403.

24.- BESSIS M. y MANDON P.. La microsphérulation et les formes myéliniques des globules rouges. Examen comparé au microscope électronique à balayage et à transmission. Nouv Rev Franç Hématol 1.972; 12: 443-454.

25.- BESSIS M. y WEED R. I.. Preparation of red blood cells for Scanning Electron Microscopy: a survey of various artifacts. Scan Electron Microsc 1.978; II: 290-296.

26.- BESSIS M., WEED R. I. y LEBLOND P. F.. Red cell shape: physiology, pathology, ultrastructure. En Bessis M., Weed R. I. y Leblond P., eds. Red Cell Shapes. New York, Springer Verlag. 1.973:

212-225.

27.- BIRCHMEIER W. y SINGER S. J.. On the mechanism of ATP-induced shape changes in human erythrocyte membranes. II. The role of ATP. J Cell Biol 1.977; 73: 647-659.

28.- BOULIEU R., BORY C. y GONNET C.. Liquid-Chromatographic measurement of purine nucleotides in blood cells. Clin Chem 1.985; 31: 727-731.

29.- BOYDE A.. Do's and don'ts in biological specimen preparation for the Scanning Electron Microscopy. Scan Electron Microsc 1.976; 1: 683-690.

30.- BOYDE A. y TAMARIN A.. Improvement to critical point drying techniques for Scanning Electron Microscopy. Scanning 1.984; 6: 30-35.

31.- BRATTEBY L. E. y SWANSTROM S.. Hypoxanthine concentration in plasma during the first two hours after birth in normal and asphyxiated infants. Pediatr Res 1.982; 16: 152-155.

32.- BRECHER G. y BESSIS M.. Present status of spiculed red cells and their relationship to the discocyte-echinocyte transformation: A critical review. Blood 1.972; 40: 333-344.

33.- BRETON-GORIUS Y. GUICHARD J.. Etude au microscope électronique de la localisation des peroxydase dans les cellules de la moelle osseuse humaine. Nouv Rev Franç Hématol 1.969; 9: 678-682.

34.- BRETON-GORIOUS J., DANIEL M. T., CLAUVEL J. P. y DREYFUS B.. Anomalies ultraestructurales des erythroblastes et des erythrocytes dans six cas des dyserythropoiese congenitale. Nou Rev Franç Hématol 1.973; 13: 23-29.

35.- BROOKE M. H., PATTERSON V. H. y KAISER K. K.. Hypoxanthine and McArdle disease: A clue to metabolic stress in the working forearm. Muscle & Nerve 1.983; 6: 204-206.

36.- BULL B. S. y BRAILSFORD J. D.. A new method of measuring the deformability of the red cell membrane. Blood 1.975; 45: 581-586.

37.- BULL B. S. y KUHN I. N.. The production of shistocytes by fibrin strands (A Scanning Electron Microscopy Study). Blood 1.970; 35: 104-111.

38.- BUNYARATVEJ A., SAHAPHONG S., BHAMARAPRAVATI N. y WASI P.. Quantitative changes on red blood cell shapes in relation to clinical features in B-Thalassemia HbE disease. Am J Clin Pathol 1.985; 83: 555-559.

39.- BURROWS B. y EARLE R. H.. Course and prognosis of chronic obstructive lung disease: a prospective study of 200 patients. N Engl J Med 1.969; 280: 397-404.

40.- CARRANZA RAMOS R.. Degradación de nucleótidos de adenina como índice de sufrimiento fetal. Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Madrid. 1.986.

41.- CHENG L. Y. y TAM J. W.. Chemical modification of hemoglobin in intact whole cells: Morphological studies by scanning electron microscope. *Int J Biochem* 1.982; 14: 461-465.

42.- CHIEN S., USAMI S., DELLENBACK R. J. y GREGERSEN M.. Blood viscosity: influence of erythrocyte deformation. *Science* 1.967; 157: 827-829.

43.- COHEN A. L.. Critical point Drying. En Hayat M. A., ed. *Principles and technique of Scanning Electron Microscopy*. New York, Van Nostrand Reinhold. 1.974.

44.- COHEN A. L., MARLOW D. P. y GARNER G. E.. A rapid critical point method using fluorocarbons (freons) as intermediated and transitional fluids. *J Microsc* 1.968; 7: 331-342.

45.- COHEN P. J.. The metabolic function of oxygen and biochemical lesions of hypoxia. *Anesthesiology* 1.972; 37: 148-177.

46.- CONDE E., MAZO E., BARO J., LAFARGA M., CUADRADO M. A., RECIO M. y ZUBIZARRETA A.. Transmission and Scanning electron microscopy study on congenital dyserythropoietic anemia type I. *Acta Haemat* 1.983; 70: 243-249.

47.- DARDANO J. R. y KIMZEY S. L.. SEM studies of erythrocyte shape as an indication of erythrocyte function. *Scan Electron Microsc* 1.979; III: 809-814.

48.- DAVIS A. L. y McCLEMENT J. H.. Chronic obstructive pulmonary disease: a prospective 15-17 year study. En Johnston R. F., ed. Pulmonary Care. New York, Grune & Stratton 1.973: 267-282.

49.- DE BAULT L. E.. A critical point drying technique for scanning electron microscopy of tissue culture cells grown in plastic substratum. Scan Electron Microsc 1.976; 1: 317-324.

50.- DE HARVEN E., SOLIGO D. y LAMPEN N. Scanning Electron Microscopy of human leucocytes. Scan Electron Microsc 1.984; II: 773-782.

51.- DEL MAESTRO R. F., THAW H. H., BJORK J., PLANKERN N. y ARFORS K. E.. Free radicals as mediators of tissue injury. Acta Physiol Scand 1.980; 492 (suppl): 43-57.

52.- DEUTICKE B.. Transformation and restoration of biconcave shape of human erythrocytes induced by amphiphilic agents and changes of ionic environment. Biochem Biophys Acta 1.968; 163: 494-503.

53.- DIONSI D., GALEOTTI T., TERREHOVE T. y AZZI A.. Superoxide radicals and hydrogen peroxide formation in mitochondria from normal and neoplastic tissues. Biochem Biophys Acta 1.975; 203: 292-300.

54.- DJALDETTI M., FISHMAN P., CHAIMOFF C., KESSLER E., MITTELMAN M. y HART J.. Severe alterations of red blood cells from the vessels of colorectal tumors. Arch Pathol Lab Med 1.985; 109: 62-64.

55.- DOMENECH I MASSONS, J. M.. Bioestadística: Métodos estadís-

ticos para investigadores. Barcelona, Herder. 1.980.

56.- DOSMAN J. A., CRAWHALL J. C. y KLASSEN G. A.. Uric acid kinetic studies in the immediate post-myocardial infarction period. *Metabolism* 1.975; 24: 473-480.

57.- DYLLA H. F. y ABRAMS J. H.. Scanning electron-resistance desorption microscopy of red blood cells. *Scan Electron Microsc* 1.984; III: 1219-1224.

58.- EDWARDS N. L., RECKER D., AIROZO D. y FOX I. H.. Enhanced purine salvage during allopurinol therapy: as important pharmacologic property in humans. *J Lab Clin Med* 1.981; 98: 673-683.

59.- ELION G. B.. Enzymatic and metabolic studies with allopurinol. *Ann Rheum Dis* 1.966; 25: 608-614.

60.- EUROPEAN COMMUNITY FOR COAL AND STEEL. Static lung volumes and capacities. En Quanjer P. H., ed. Standardized lung function testing. *Bull Europ Physiopath Resp* 1.983; 19 (suppl): 11-21.

61.- EUROPEAN COMMUNITY FOR COAL AND STEEL. Summary equations of reference values. En Quanjer P. H., ed. Standardized lung function testing. *Bull Europ Physiopath Resp* 1.983; 19 (suppl): 45-51.

62.- EVANS E. A. Bending resistance and chemically induced moments in membrane bilayers. *Biophys J* 1.974; 14: 923-931.

63.- FALLER J. y FOX I. H.. Ethanol-induced hyperuricemia. Evidence for increased urate production by activation of adenine nucleotide turnover. N Engl J Med 1.982; 307: 1598-1602.

64.- FARBER M. O., ROBERTS L. R., WEINBERGER M. H., ROBERTSON G. L., FINEBERG N. S. y MANFREDI S.. Abnormalities of sodium and H₂O handling in chronic obstructive lung disease. Arch Intern Med 1.982; 142: 1326-1330.

65.- FARNSWORTH P. N., NADEL M. R. y STOLL B. J.. Surface ultramicroscopy of sickle cells. Nature 1.970; 225: 190-191.

66.- FEO G. y PHILLIPS W. M.. The influence of suspension osmolarity and erythrocyte volume on cell deformability. Nouv Rev Franç Hématol 1.982; 24: 295-299.

67.- FEO G., TCHERNIA G., SUBTIL E. y LEBLOND P. F.. Observation of echinocytosis in eight patients: A phase contrast and SEM study. Br J Haematol 1.978; 40: 519-526.

68.- FISHMAN A. P.. Chronic Cor Pulmonale. Am Rev Respir Dis 1.976; 114: 775-795.

69.- FLENLEY D. C.. Oxygénothérapie à long terme à domicile. En Lévi-Valensi P., ed. Le traitement ambulatoire des handicapés respiratoires. Paris, Masson. 1.982: 21-36.

70.- FOX A. C., REED G. E., GLASSMAN E., KALTMAN A. J. y SILK B. B.

Release of adenosine from human hearts during angina induced by rapid atrial pacing. *J Clin Invest* 1.974; 53: 1447-1457.

71.- FOX A. C., REED G. E., MEILMAN H. y SILK B. B.. Release of nucleosides from canine and human hearts as an index of prior ischemia. *Am J Cardiol* 1.979; 43: 52-58.

72.- FOX I. H.. Metabolic basis for disorders of purine nucleotide degradation. *Metabolism* 1.981; 30: 616-634.

73.- FOX I. H.. Disorders of purine and pyrimidine metabolism. En Spittell J. A., ed. *Clinical Medicine* vol 9. Philadelphia, Harper & Row Publishers. 1.982: 1-43.

74.- FOX I. H.. Adenosine triphosphate degradation in specific disease. *J Lab Clin Med* 1.985; 106: 101-110.

75.- FOX I. H. y KELLEY W. N.. Studies on the mechanism of fructose induced hyperuricemia in man. *Metab Clin Exp* 1.972; 21: 713-721.

76.- FOX I. H., WYNGAARDEN J. B. y KELLEY W. N.. Depletion of erythrocyte phosphoribosylpyrophosphate in man. A newly observed effect of allopurinol. *N Engl J Med* 1.970; 283: 1177-1182.

77.- FRIDOVICH I.. The biology of oxygen radicals. *Science* 1.978; 201: 875-877.

78.- FUJITA T., TOKUNAGA J. e INOUE H.. Células sanguíneas humanas.

En Fujita T., Tokunaga J. e Inove H., eds. Atlas de Microscopía Electrónica en Medicina. Barcelona, Espax. 1.972.

79.- FULMER J. D. y SNIDER G. L.. ACCP-NHLBI national conference on oxygen therapy. Chest 1.984; 86: 234-247.

80.- GAMLIEL H. y POLLIACK A.. Positive identification of human leukemic cells with scanning immunoelectron microscopy, using antibody coated Polystyrene (latex) beads as markers. Scand J Haematol 1.981; 26: 297-305.

81.- GARCIA J. M., CANTERO J., GIL B., REVELLES F. y CAMPOS A.. Morfología eritrocítica en las anemias ferropénicas. Estudio con Microscopía Electrónica de Barrido. Histología Médica 1.986; 2: 17-22.

82.- GARCIA J. M., CRESPO P. V., CAÑIZARES F. J., REVELLES F. y CAMPOS A.. Técnica de fraccionamiento de médula ósea para Microscopía Electrónica de Barrido. Histología Médica 1.985; 1: 11-18.

83.- GARCEAU C., LEBLOND P. F., LYONNAIS T. y BEAUPRE A.. Morphologie et deformabilité des erythrocytes dans la dystrophie musculaire. Nouv Rev Franç Hématol 1.978; 20: 585-598.

84.- GHOSH P., COHRANC A. M. G., GORDON P. W. N. y RADCLIFFE A. G.. Changes in plasma urate concentration immediately after acute myocardial infarction. Br Med J 1.975; 4: 261-262.

85.- GIGLIO M. J. y BOZZINI C. E.. Effect of indomethacin on red cell volume, iron kinetics and red cell survival in mice. *Exp Hematol* 1.982; 10: 487-492.

86.- GOMEZ P.. Efectos de la hipoxemia sobre la función renal y degradación de nucleótidos purínicos. Modificaciones inducidas por la oxigenoterapia. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Madrid. 1.985.

87.- GRANGER D. N., McCORD J. M., PARKS D. A. y HOLLWARTH M. E.. Xanthine oxidase inhibitors attenuate ischemia-induced vascular permeability changes in the cat intestine. *Gastroenterology* 1.986; 90: 80-84.

88.- GRASSO J. A., SWIFT H. y ACKERMAN G. A.. Observations on the development of erythrocytes in mammalian fetal liver. *J Cell Biol* 1.962; 14: 235-254.

89.- GREENWALT T. J., LAN F. O., SWIERK E. M. y WILLIAMS R. E.. Studies of erythrocyte membrane loss produced by amphipathic drugs and vitro storage. *Br J Haematol* 1.978; 39: 551-557.

90.- GREENE H. L., WILSON F. A. y HEFFERRAN P.. ATP depletion a posible role in the pathogenesis of hyperuricemia in glycogen storage disease type I. *J Clin Invest* 1.978; 62: 321-328.

91.- GRUM C. M., SIMON R. H., DANTZKER D. R. y FOX I. H.. Evidence for adenosine triphosphate degradation in critically ill patients.

Chest 1.985; 88: 763-767.

92.- HARKNESS R. A.. Cerebrospinal fluid concentrations of hypoxanthine, xanthine and inosine: high concentrations of the ATP metabolite hypoxanthine after hypoxia. J Clin Pathol 1.983; 36: 1-8.

93.- HARKNESS R. A., COADE S. B. y WEBSTER D. B.. ATP, ADP and AMP in plasma from peripheral venous blood. Clin Chem Acta 1.984; 143: 91-98.

94.- HARKNESS R. A., GEIRSSON R. T. y McFAYEN J. R.. Concentrations of hypoxanthine, xanthine, uridine and urate in amniotic fluid at caesarean section and the association of raised levels with prenatal risk factors and fetal distress. Br J Obst Gynecol 1.983; 90: 815-820.

95.- HARKNESS R. A., SIMMONDS R. J. y COADE S. B.. Purine transport and metabolism in man: the effect of exercise on concentrations of purine bases, nucleosides and nucleotides in plasma, urine, leucocytes and erythrocytes. Clinical Science 1.983; 64: 333-340.

96.- HARKNESS R. A., WHITELAW A. G. L. y SIMMONDS A. H.. Intrapartum hypoxia: association between neurological assessment of damage and abnormal excretion of ATP metabolites. J Clin Pathol 1.982; 35: 999-1007.

97.- HARMSEN E., DE JONG J. W. y SERRUYS P. W.. Hypoxanthine production by ischemic heart demonstrated by high pressure liquid

chromatography of blood purine nucleosides and oxypurines. Clin Chem Acta 1.981; 115: 73-84.

98.- HARRISON B. D. W. y STOKES T. C.. Secondary polycythaemia: its causes, effects and treatment. Br J Dis Chest 1.982; 76: 313-340.

99.- HARTER J. G.. Serum uric acid levels in patients with bronchial asthma. J Allergy 1.968; 42: 88-95.

100.- HASDAY J. D. y GRUM C. M.. Nocturnal increase of urinary uric acid:creatinine ratio. A biochemical correlate of sleep-associated hypoxemia. Am Rev Respir Dis 1.987; 135: 534-538.

101.- HATTORI A.. Contribution of scanning electron microscopy to recent advances in hematology. Biomed Res 1.981; suppl 2: 199-208.

102.- HITCHINGS G. H.. Effects of allopurinol in relation to purine biosynthesis. Ann Rheum Dis 1.966; 25: 601-607.

103.- IGISU H. y MAWATARI S.. Effect of propranolol on ATP in human erythrocytes-comparison with ouabain. Biochem Med 1.980; 23: 70-75.

104.- INGEBREITSEN O. C., BAKKEN A. M. y FARSTAD M.. Liquid chromatography of serotonin and adenosine nucleotides in blood platelets, illustrated by evaluation of functional integrity of platelets prepa-

rations. Clin Chem 1.985; 31: 695-698.

105.- ISOMAKI H. y KREUS K. E.. Serum and urinary uric acid in respiratory acidosis. Preliminary report. Acta Med Scand 1.968; 184: 293-296.

106.- JAQUES W. E., COALSONS J. y ZERVINS H.. Application of the scanning electron microscope to human tissues. A preliminary study. Exp Molecu^l Pathol 1.965; 4: 576-580.

107.- KAGEYAMA N.. A direct colorimetric determination of uric acid in serum and urine with uricase-catalase system. Clin Chem Acta 1.971; 31: 421-426.

108.- KASHULINA A. P. y TERESHCHENKO I. P.. State of the erythrocyte surface (echinocytosis) in experimental carcinogenesis. Bull Exp Biol Med 1.979; 87: 476-478.

109.- KASTNITZ P., DRUGER G. L., YORRA F. y SIMMONS D. H.. Mixed venous oxygen tension and hyperlactatemia. Survival in severe cardiopulmonary disease. JAMA 1.976; 236: 570-574.

110.- KAWAKAWI Y., KISHI F., YAMAMOTO H. y MIYAMOTO K.. Relation of oxygen delivery, mixed venous oxygenation and pulmonary hemodynamics to prognosis in chronic obstructive pulmonary disease. N Engl J Med 1.983; 308: 1045-1049.

111.- KAYDEN H. J. y BESSIS M.. Morphology of normal erythrocyte

and acanthocyte using Normarski optics and the scanning electron microscope. *Blood* 1.970; 35: 427-436.

112.- KEITT A. S.. Diagnostic strategy in a suspected red cell enzymopathy. En Mentzer W. C., ed. *Enzymopathies. Clinics in Haematology*. Vol 10. 1. Londres, W. B. Saunders. 1.981: 3-30.

113.- KELLEY W. N.. Approach to the patient with hyperuricemia. En Kelley W. N., Harris E. D., Ruddy S. y Sledge C. B., eds. *Textbook of Rheumatology*. Philadelphia, W. B. Saunders. 1.981; 494-500.

114.- KELLEY W. N. y WYNGAARDEN J. B.. Effects of allopurinol and oxipurinol on purine synthesis in cultured human cells. *J Clin Invest* 1.970; 49: 602-609.

115.- KERKHOVEN P., MARTI H. R. y HUG G.. Electron microscopic and biochemical observations on erythroid cells in congenital dyserythropoietic anemia type II. *Virchows Arch Path Anat* 1.974; 363: 1-7.

116.- KHOKHAR N.. Gouty arthritis in chronic obstructive pulmonary disease. *Arch Intern Med* 1.982; 142: 838-848.

117.- KILBURN K. H. y DOWELL A. R.. Renal function in respiratory failure. Effects of hypoxia, hyperoxia and hypercapnia. *Arch Intern Med* 1.971; 127: 754-762.

118.- KLABUNDE R. E.. Dipyridamole inhibition of adenosine metabolism in human blood. *Eur J Pharmacol* 1.983; 93: 21-26.

119.- KNOLL M.. Static potential of bodies under electron irradiation. *Tec Phys* 1.935; 16: 467-471.

120.- KRAKOFF I. H.. Xanthine oxidase inhibition in the management of hyperuricemia in leukemias and lymphomas. *Arthritis Rheum* 1.965; 8: 896-898.

121.- LA CELLE P. L.. Alteration of deformability of the erythrocyte membrane in stored blood. *Blood* 1.969; 9: 238-245.

122.- LEBLOND P. F., DE BOISFLEURY A. y BESSIS M.. La forme des erythrocytes dans la spherocytose hereditaire. Etude au microscope à balayage. Relation avec leur deformabilité. *Nouv Rev Franç Hematol* 1.973; 13: 873-883.

123.- LEBLOND P. F. y SHOUCRI R.. Calculation of area and volume of human erythrocytes from scanning electron micrographs. *J Microsc* 1.978; 113: 161-170.

124.- LE CHARPENTIER Y PRENANT M.. Isolement de l'ilot erythroblastique. Etude en microscopie optique et électronique à balayage. *Nouv Rev Franç Hématol* 1.975; 15: 119-140.

125.- LEWIS J. M. y VERWILGHEN R. L.. Dyserythropoiesis and dyserythropoietic anemia. En Brown E. B., ed. *Progress in Hematology*. Vol III. New York, Grune & Stratton. 1.973: 99-129.

126.- LIEBER M. R., LANGE Y., WEINSTEIN R. S. y STECK T.. Interac-

tion of chlorpromazine with the human erythrocyte membrane. *J Biol Chem* 1.984; 259: 9225-9234.

127.- LONGSTER G. H. y TOVEY L. A.. The effects of certain blood-grouping sera on the red cell surface as seen by the scanning electron microscope. *Br J Haematol* 1.972; 23: 635-640.

128.- LOPEZ M., GARCIA J., MATEOS F., GOMEZ P., CASAS E. y MICHAN A.. Degradación de los nucleótidos de adenina en la hipoxemia. XVI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Reumatología. Vigo. 1.986.

129.- LOWSON K. V., DRUMMOND M. F. y BISHOP J. M.. Costing new services: long-term domiciliary oxygen therapy. *Lancet* 1.981; 1: 1146-1149.

130.- MACIAS F.. Biología celular eritrocítica en la anemia ferropénica de la primera infancia. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. Universidad de Granada. 1.986.

131.- MACIAS F., GARCIA J., CRESPO P., MOJON M., MUÑOZ A. y NARBONA E.. Aplicación de la Microscopía Electrónica de Barrido en el estudio de la enfermedad hemolítica del recién nacido. En Molina Font J. A., ed. Abstracts II Jornadas de Neonatología. Granada. 1.986.

132.- MACIAS F., GARCIA J. M., FERNANDEZ E. y CAMPOS A.. Estudio microscópico con microscopía electrónica de barrido de los tipos eritrocíticos en la anemia ferropénica de la primera infancia. Histo-

logía Médica 1.986; 2: 27-32.

133.- MANZKEH H., DORNERK C. y GRUNITZ J.. Urinary hypoxanthine, xanthine and uric acid excretion in newborn infants with perinatal complications. Acta Pediatr Scand 1.977; 66: 713-717.

134.- MARTIN A., LUNA J. D., SANCHEZ E. y BOLAÑOS J.. Bioestadística. Granada, Editorial Luz. 1.975.

135.- MAZIA D., SALE W. S. y SCHATTEN G.. Polylysine as an adhesive for electron microscopy. J Cell Biol 1.974; 63: 212-217.

136.- MAZIA D., SCHATTEN G. y SALE W. Adhesion of cells to surfaces coated with polylysine. Applications to electron microscopy. J Cell Biol 1.975; 66: 198-200.

137.- McCORD J. M.. Free radicals and inflammation: protection of synovial fluid by superoxyde dismutase. Science 1.974; 185: 529-531.

138.- McCORD J. M.. Oxygen derived free radicals in postischemic tissue injury. N Engl J Med 1.985; 312: 159-163.

139.- McLENNAN G., OBERLEY L. W. y AUTHOR A. P.. The role of oxygen free radicals in radiation-induced damage and death of nondividing eukaryotic cells. Radiat Res 1.980; 84: 122-132.

140.- MEDICAL RESEARCH COUNCIL WORKING PARTY. Long-term domiciliary

oxygen therapy in chronic hypoxic cor pulmonale complicating chronic bronchitis and emphysema. *Lancet* 1.981; 1: 681-686.

141.- MIALE J. B.. Anemia aplásica, trastornos mieloproliferativos, leucemia y linfoma. En Miale J. B., ed. *Hematología. Medicina de Laboratorio*. Barcelona, Reverté. 1.985: 771-860.

142.- MITCHELL R. S., WEBB N. C. y FILLEY G. F.. Chronic obstructive bronchopulmonary disease. III. Factors influencing prognosis. *Am Rev Resp Dis* 1.964; 89: 878-896.

143.- MITHOEFER J. C.. Indications for oxygen therapy in chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Resp Dis* 1.974; 110: 35-39.

144.- MOHANDAS N, CHASIS J. A. y SHOHET S. B.. The influence of membrane skeleton on red cell deformability, membrane material properties and shape. *Semin Hematol* 1.983; 20: 225-242.

145.- MORITA Y., NISHIDA Y., KAMATANI N. y MIYAMOTO T.. Theophylline increases serum uric acid levels. *J Allergy Clin Immunol* 1.984; 74: 707-712.

146.- NAGEL J. y BILLAT C.. L'ilot erythroblastique, unité anatomique du tissue hematopoietic du foie de rat. *Arch Anat Micr Morph Exp* 1.974; 63: 147-162.

147.- NATHAN C., CREQUE L. y NAVARRO C.. Compartmentalization of iron in sickle cell anemia. An autopsy study. *Am J Clin Pathol*

1.985; 83: 76-78.

148.- NOCTURNAL OXYGEN THERAPY TRIAL GROUP. Continuous or nocturnal oxygen therapy in hypoxemic chronic obstructive lung disease. Ann Intern Med 1.980; 93: 391-398.

149.- NORTON J. M. y RAND P. W.. Decreased deformability of erythrocytes from smokers. Blood 1.981; 57: 671-674.

150.- OATLEY C. W.. The scanning electron microscope. Scientific Progress 1.965; 54: 483-498.

151.- OATLEY C. W., NIXON W. C. y PEASE R. F.. Scanning electron microscopy. Advances in electronics and electron. Physics 1.965; 21: 181-187.

152.- OWEN J. A., IGGO B., SCANDRETT E. J. y STEWART C. P.. The determination of creatinine in plasma and serum and in urine: a critical examination. Biochem J 1.954; 58: 426-437.

153.- PATTERSON V. H., KAISER K. K. y BROOKE M. H.. Forearm exercise increases plasma hypoxanthine. J Neurol Neurosurg Psychiatry 1.982; 45: 552-553.

154.- PETKAU A., CHELACK W. S., PLESKACH S. D., MEEKER B. E. y BRADY C. M.. Radioprotection of mice by superoxyde dismutase. Biochem Biophys Res Commun 1.975; 65: 886-893.

155.- PETTY T. L., NEFF T. A., CREAGH C. E., SUTTON F. D., NETT L. M., BAILEY D. y FERNANDEZ E.. Outpatient oxygen therapy in chronic obstructive pulmonary disease. A review of 13 years' experience and an evaluation of modes of therapy. Arch Intern Med 1.979; 139: 28-32.

156.- PLUM F., POSNER J. B. y HAIN R. F.. Delayed neurological deterioration after anoxia. Arch Intern Med 1.962; 110: 56-63.

157.- POLICARD A. y BESSIS M.. Sur un mode d'incorporation des macromolecules par les cellules, visible on microscope électronique: la ropheocytose. C. R. Acad Sci (Paris) 1.958; 246: 3194-3197.

158.- POLLIACK A., NILSSON K., LASKOV R. y BIBERFELD P.. Characteristic surface morphology of human and murine myeloma cells: a scanning and transmission electron microscopy study. Br J Haematol 1.978; 39: 25-32.

159.- PONDER E.. Hemolysis and related phenomena. New York, Grune & Stratton. 1.948.

160.- PRYOR W. A.. Free radicals in biology. The involvement of radical reactions in ageing and carcinogenesis. Med Chem 1.977; 5: 3310-3333.

161.- PUIG J. G. y FOX I. H.. Ethanol induced activation of adenine nucleotide turnover. Evidence for a role of acetate. J Clin Invest 1.984; 74: 936-941.

162.- RAMOS T., GARCIA J., TOVAR I., MARTINEZ M. E., HERRERO E. y MATEOS F.. Determinación simultánea de bases y nucleósidos purínicos por cromatografía líquida de alta precisión (HPLC). XXXI Congreso Nacional de la Asociación Española de Biopatología Clínica. Santa Cruz de Tenerife. 1.984.

163.- REMME W. J., DE JONG J. W. y VERDOUW P. D.. Effects of pacing induced myocardial ischemia on hypoxanthine efflux from the human heart. *Am J Cardiol* 1.977; 40: 55-62.

164.- ROE T. F. y KOGUT M. D.. The pathogenesis of hyperuricemia in glycogen storage disease, type I. *Pediatr Res* 1.977; 11: 664-669.

165.- ROMERO CANDEIRA S., SANCHEZ L., RODRIGUEZ J. E., POSADA J. L., GOMEZ P. y CALATRAVA J. M.. Utilidad de la determinación de la presión parcial de oxígeno en sangre venosa mezclada en la indicación de la oxigenoterapia a enfermos con bronconeumopatía obstructiva crónica. *Arch Bronconeumol* 1.978; 14: 118-122.

166.- ROZMAN C. y WOESSNER S.. Aspectos ultraestructurales de las anemias megaloblásticas. *Sangre* 1.975; 20: 437-448.

167.- ROZMAN C. y WOESSNER S.. Ultraestructura celular en Hematología. Barcelona, Salvat. 1.976.

168.- RUNDLES R. W.. The development of allopurinol. *Arch Intern Med* 1.985; 145: 1492-1503.

169.- RUNDLES R. W., WYNGAARDEN J. B. y HITCHINGS G. H.. Effects of a xanthine oxidase inhibitor on thiopurine metabolism, hyperuricemia and gout. *Trans Assoc Am Physicians* 1.963; 76: 126-140.

170.- SALSBURY R. CLARKE J. A.. New method for detecting changes in the surface appearance of human red blood cells. *J Clin Pathol* 1.967; 20: 603-610.

171.- SANCHEZ AGUDO L.. Grupo de Trabajo de la SEPAR. Normativa para la indicación y empleo de la oxigenoterapia crónica domiciliaria (OCD). Barcelona, DOYMA. 1.985: 3-24.

172.- SANDERS S. K., ALEXANDER E. L. y BRAYLAN R. C.. A high-yield technique for preparing cells fixed in suspension for scanning electron microscopy. *J Cell Biol* 1.975; 67: 476-480.

173.- SANFEY H., BULKLEY G. B. y CAMERON J. L.. The role of oxygen free radicals in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Ann Surg* 1.984; 200: 405-413.

174.- SANFEY H., BULKLEY G. B. y CAMERON J. L.. The pathogenesis of acute pancreatitis: The source and role of oxygen-derived free radicals in three different experimental models. *Ann Surg* 1.985; 201: 633-639.

175.- SAUGSTAAD O. D.. Hypoxanthine as a measurement of hypoxia. *Pediatr Res* 1.975; 9: 158-161.

176.- SAUGSTAAD O. D.. Oxygen radicals and pulmonary damage. *Pediatr Pulmonol* 1.985; 1: 167-175.

177.- SAUGSTAAD O. D. y AASEN A. O.. Plasma hypoxanthine levels as a prognosis aid of tissue hypoxia. *Eur Surg Res* 1.980; 12: 123-129.

178.- SAUGSTAAD O. D., BECHER G., GROSSMANN T., MERKER G., ODDOY A. y LACHMANN B.. Acute and chronic effects of xanthine oxidase on lung thorax-compliance in guinea pigs. *Intensive Care Med* 1.987; 13: 30-32.

179.- SAUGSTAAD O. D., HALLMAN M., ABRAHAM J., COHRANE C. G., EPSTEIN B. y GLUCK L.. Hypoxanthine and oxygen induced lung injury: a possible basic mechanism of tissue damage? . *Pediatr Res* 1.984; 18: 501-504.

180.- SAUGSTAAD O. D., ZIEGLER M. G. y KESSEL B.. Correlation of plasma hypoxanthine and catecholamine levels in the umbilical vein. *J Perinat Med* 1.986; 14: 339-343.

181.- SCHRIER J. L. y JUNGER I.. Entry and distribution of chlorpromazine and vinblastine into human erythrocytes during endocytosis. *Proc Soc Expl Biol Med* 1.981; 168: 159-167.

182.- SCHWEINSBERG P. D. y LOO T. L.. Simultaneous analysis of ATP, ADP, AMP and other purines in human erythrocytes by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1.980; 181: 103-107.

183.- SHEETZ M. P.. Membrane Skeletal Dynamics: Role in modulation of red cell deformability, mobility of transmembrane proteins, and shape. Semin Hematol 1.983; 20: 175-188.

184.- SHEETZ M. P. y SINGER S. J.. Biological membranes as bilayers couples a molecular mechanism of drug-erythrocyte interaction. Proc Nat Acad Sci USA 1.974; 71: 4457-4462.

185.- SHELTON E. y MOWCZKO M. E.. Membrane blisters artefact: A study in fixation for Scanning Electron Microscopy. Scanning 1.978; 1: 166-173.

186.- SIMMONDS R. J. y HARKNESS R. A.. High performance liquid chromatography methods for base and nucleoside analysis in extracellular fluids and in cells. J Chromatogr 1.981; 226: 369-381.

187.- SMITH J. A., LONERGAN E. T. y STERLING K.. Spur cell anemia. Hemolytic anemia with red cells resembling acanthocytes in alvoholic cirrhosis. N Engl J Med 1.964; 271: 396-398.

188.- SOLIGO D., DE HARVEN E., POZZOLI E., NAVA M. T., POLLI N. y LAMBERTENGI-DELILIERIS G.. Scanning electron microscope citochemistry of blood cells. Scan Electron Microsc 1.985; II: 817-825.

189.- STEVENS J. B. y AUTOR A. P.. Proposed mechanisms for neonatal rat tolerance to normobaric hypoxia. Fed Proc 1.980; 39: 3138-3143.

190.- STUART J.. Erythrocyte Rheology. J Clin Pathol 1.985;

38: 965-977.

191.- SUTTON J. R., TOEWS J., WARD G. R. y FOX I. H.. Purine metabolism during strenuous muscular exercise in man. *Metabolism* 1.980; 29: 254-260.

192.- SYMMANS W. A., SHEPHERD C. S. y MARSH W. L.. Hereditary Acanthocytosis associated with the McLeod phenotype of the Kell blood group system. *Br J Haematol* 1.979; 42: 575-583.

193.- TOTTER J. R.. Spontaneous cancer and its possible relationship to oxygen metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1.980; 77: 1763-1767.

194.- TRUONG H. T., FERREL J. E. Jr y HUESTIS W. H.. Sulfhydryl reducing agents and shape regulation in human erythrocytes. *Blood* 1.986; 67: 214-221.

195.- VALAT J. P., LAMISSE F., LE CHEVALIER P. L., GAUTIER J., GINIES G. y JACOB C.. Les variations de l'uricémie au cours des descompensations respiratoires aiguës des bronchopathies chroniques. A propos de 100 observations. *Rev Rheum Mal Osteoartic* 1.974; 41: 179-184.

196.- VAYA A., MIRA Y., TERUEL M. y AZNAR J.. Estudio de la deformabilidad eritrocítica en las anemias microcíticas hipocromas. *Sangre* 1.984; 29: 36-41.

197.- VIVES CORRONS J. L., BERGA L. L., AGUILAR J. L., MARTINEZ M. J., INSA M. J., ROZMAN C. y JOU J. M.. Comportamiento reológico

de los hematíes en la esferocitosis hereditaria. Sangre 1.980; 25: 192-201.

198.- VOMEL T.. Diameters of erythrocytes of different ages measured by scanning electron microscopy. Mech Aging Devel 1.980; 13: 357-365.

199.- VON ARDENE M.. Scanning electron microscope practical considerations. J Phys 1.938; 109: 533-540.

200.- WATTS R. W. E., WATTS J. E. M. y SEEGMILLER J. E.. Xanthine oxidase activity in human tissues and its inhibition by allopurinol (4 hydroxypyrazolo (3-4 di pyrimidine)). J Lab Clin Med 1.965; 66: 688-692.

201.- WEBSTER H. K. y WHAUN J. M.. Application of simultaneous UV-Radioactivity High performance liquid chromatography to the study of intermediary metabolism. I. Purine nucleotides, nucleosides and bases. J Chromatogr 1.981; 209: 283-292.

202.- WEED R. I. y BESS M.. The dyscocyte-stomatocyte equilibrium of normal and pathologic red cells. Blood 1.973; 41: 471-475.

203.- WEISFELDT M. L.. Reperfusion and reperfusion injury. Clin Res 1.987; 35: 13-20.

204.- WHITE J. G.. Effects of an ionophore, A23187, on the surface morphology of normal erythrocytes. Am J Pathol 1.974; 77: 507-519.

205.- WHITE J. G.. Scanning electron microscopy of erythrocyte deformation: the influence of a calcium ionophore A23187. *Sem Haematol* 1.976; 13: 121-132.

206.- WIENER K.. Uraemia and hyperuricaemia in acute myocardial infarction. *Clin Chem Acta* 1.976; 73: 45-50.

207.- WILEY J. S., COOPER R. A., ADACHI K. y ASAKURA T.. Hereditary stomatocytosis: Association of low 2-3 diphosphoglycerate with increase cation pumping by the red cell. *Br J Haematol* 1.979; 41: 133-141.

208.- WILEY J. S., ELLORY J. C., SHUMAN M. A., SHALLER C. C. y COOPER R. A.. Characteristics of the membrane defect in the hereditary stomatocytosis syndrome. *Blood* 1.975; 46: 337-356.

209.- WILLIAMSON J. R., GARDNER R. A., BOYLAN C. W., CARROL G. L., CHANG K., MARVEL J. S., GONEN B., KILO C., TRAN-SOY-TAY R. y SUTERA S. P.. Microrheologic investigation of erythrocyte deformability in diabetes mellitus. *Blood* 1.985; 65: 283-288.

210.- WILLIAMSON J. R., SHANAHAN M. O. y HOCHMUTH R. M.. The influence of temperature on red cell deformability. *Blood* 1.975; 46: 611-624.

211.- WOOLLISCROFT J. A., COLFER H. y FOX I. H.. Hyperuricemia in acute illness: a poor prognostic sign. *Am J Med* 1.982; 72: 58-62.

212.- YOSHINO M., HAYASHI R., KATSUMATA Y., MORI S. y MITARAI G..

Blood oxypurines and erythrocyte 2-3 diphosphoglycerate levels at high altitude hypoxia. *Life Sci* 1.980; 27: 1265-1269.

213.- ZAKARIA M. y BROWN P. R.. High-performance liquid column chromatography of nucleotides, nucleosides and bases. *J Chromatogr* 1.981; 226: 267-290.

214.- ZIPURSKY A., BROWN E., PALKO J. y BROWN E. J.. The erythrocyte differential count in newborn infants. *Am J Pediatr Hematol/Oncol* 1.983; 5: 45-51.