



UNIVERSIDAD DE LEÓN
Facultad de Veterinaria
Departamento de Medicina, Cirugía y Anatomía
Veterinaria

El jerbo como modelo de anemia por oxidación

Marcos Malvar Cerdeira

León, 2011



UNIVERSIDAD DE LEÓN
Facultad de Veterinaria
Departamento de Medicina, Cirugía y Anatomía
Veterinaria

El jerbo como modelo de anemia por oxidación

**Memoria que presenta el
Licenciado en Veterinaria D.
Marcos Malvar Cerdeira para
optar al Grado de Doctor en
Veterinaria.**

La realización de esta Tesis ha sido posible gracias a la Junta de Castilla y León de la que el autor ha sido Becario (Orden 11 de octubre de 2002, Boletín Oficial de Castilla y León, de 29 de octubre de 2002).

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que de una manera u otra han contribuido a la realización de este trabajo.

A los directores de esta tesis, Dra. María José Cano Rábano, Dr. Carlos César Pérez García y Dra. M^a de los Ángeles Ríos Granja, por su orientación y apoyo en la realización de este estudio. En especial a María, por su infatigable trabajo, ayuda, consejos, comprensión y su amistad; siempre estaré en deuda contigo.

Al resto de los Profesores Titulares de este Departamento por haber compartido sus conocimientos y experiencia profesional. En especial a los doctores Felipe Prieto (†), Juan Rejas y Ramiro Torío.

A Bety, por su apoyo y cariño en todos los momentos. Al resto de mis compañeros, Juan Sierra, Vicente Santamaría y Andrés Escudero por su apoyo y ayuda inestimable. A David Gallego por sus consejos y ayuda.

Al resto del personal del Departamento de Medicina, Cirugía y Anatomía Veterinaria de la Facultad de Veterinaria de León y del Animalario de la Universidad de León.

A Fernando Tejerina por su ayuda en la realización de la estadística.

A Miguel Abad Valcarce por acogerme en su casa y brindarme la oportunidad de conocer otras facultades en EEUU y Canadá.

Al Dr. Mike Scott (Michigan, EEUU) por el trato y todo lo que me enseñó durante la estancia en su facultad.

A mis amigos, Luis Antonio Merino, Fernando LLamero, Pablo Ruiz, Tomás Miguélez, Javier Campos, Argimiro Llorente, Luis Miguel Ramos, Álvaro Blanco, José Luis Vicente, Mónica Cuadrado, Eva Orejas, Juan Ramón Martínez y a las familias Acuña Malvar, Barreiro Malvar y Torío Álvarez.

A Carmen y Nerea.

A mis padres y hermanos.

A mi familia

RELACIÓN ALFABÉTICA DE ACRÓNIMOS UTILIZADOS

2,3 DPG	2,3 Difosfoglicerato
ALAT	Alanina aminotransferasa
ALB	Albúmina
ASAT	Aspartato aminotransferasa
ATP	Adenosín trifosfato
BILT	Bilirrubina total
BOE	Boletín Oficial del Estado
BUN	Nitrógeno ureico sanguíneo
°C	Grados centígrados
CEE	Comunidad Económica Europea
CHCM	Concentración de hemoglobina corpuscular media
cm	Centímetros
cm²	Centímetros cuadrados
CO	Monóxido de carbono
CO₂	Dióxido de carbono
CREA	Creatinina
dl	Decilitro
DQ	Diff Quick®
DS	Desviación estándar
EEUU	Estados Unidos
et al.	y colaboradores
FA	Fosfatasa alcalina
Fe	Hierro
fl	Femtolitros
g	Gramos
g/dl	Gramos por decilitro

gl	Grados de libertad
GSH	Glutación reducido
HCM	Hemoglobina corpuscular media
Hz	Herzios
H₂O	Agua
IM	Intramuscular
IP	Intraperitoneal
K	Potasio
Kg	Kilogramos
LDH	Lactato deshidrogenasa
l	Litros
mEq	Miliequivalentes
mg	Miligramos
ml	Mililitros
mmol	Milimoles
μl	Microlitros
μm	Micras
Na	Sodio
NADH	Nicotinamida-adenín-dinucleótido-reducida
NAD	Nicotinamida-adenín-dinucleótido
NAM	Nuevo azul de metileno
nm	Nanómetros
P₅₀	Presión a la saturación del 50%
pg	Picogramos
PHZ	Fenilhidracina
PT	Proteína total
RDW	Ancho de distribución de los glóbulos rojos

(red cell distribution width)

U

Unidades internacionales

VCM

Volumen corpuscular medio

INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	5
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	9
1. EL JERBO DE MONGOLIA	11
1.1. Origen	11
1.2. Taxonomía	11
1.3. Características anatómicas	13
1.4. Hematología	17
1.5. Bioquímica	18
1.6. Patología espontánea	19
1.7. Manejo	20
1.8. Actividad	21
1.9. Alojamiento	21
1.10. Alimentación	23
1.11. Reproducción	25
1.12. Utilización en experimentación	27
1.13. Vías de administración de fármacos	28
1.13.1. Intraperitoneal	28
1.13.2. Endovenosa	29
1.13.3. Intramuscular.....	29
1.13.4. Subcutánea	29
1.13.5. Oral	29
1.14. Toma de muestras.....	29
1.14.1. Extracción de sangre	29
1.14.2. Recogida de orina	31
1.14.3. Recogida de heces	31
1.15. Anestesia	31
1.16. Eutanasia	32
1.16.1. Dislocación y decapitación cervical	32
1.16.2. Anestésicos inhalatorios.....	32
1.16.3. Pentobarbital sódico	32
2. ERITROCITOS, HEMATÍES, GLÓBULOS ROJOS	32
2.1. Introducción	32
2.2. Eritropoyesis.....	33

2.2.1. Tipos celulares	34
2.2.2. Regulación de la eritropoyesis	35
2.3. Funciones.....	35
2.3.1. Hemoglobina.....	35
2.3.2. Efecto Bohr.....	36
2.3.3. 2,3 Difosfoglicerato.....	37
2.3.4. Transporte de CO ₂	37
2.3.5. Efecto amortiguador del pH sanguíneo	37
2.4. Metabolismo del eritrocito	37
2.4.1. Vía de la glucólisis anaerobia o vía de Embden-Meyerhoff	38
2.4.2. Vía de la glucólisis aerobia, de las hexosas-monofosfato o de las pentosas fosfato	38
2.4.3. Vía de Luebering-Rapaport o de 2,3 DPG	39
2.5. Membrana eritrocitaria.....	39
2.5.1. Estructura y organización	39
2.5.2. Equilibrio osmótico.....	41
2.6. Eritrocateresis.	41
2.6.1. Hemólisis extravascular.....	42
2.6.2. Hemólisis intravascular.....	43
3. ANEMIA	45
3.1. Signos clínicos de la anemia	45
3.2. Índices eritrocitarios	45
3.2.1. Volumen corpuscular medio	45
3.2.2. Concentración de hemoglobina corpuscular media .	45
3.2.3. Hemoglobina corpuscular media	46
3.3. Clasificación de las anemias.....	47
3.3.1. Clasificación fisiopatológica	47
3.3.2. Clasificación morfológica.....	48
3.4. Anemia hemolítica por oxidación	48
3.4.1. Protección antioxidante del eritrocito.....	48
3.4.2. Anemia hemolítica inducida por agentes químicos..	50

MATERIAL Y MÉTODOS..... 55

1. ANIMALES.....	57
2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL	57

3. TOMA DE MUESTRAS SANGUÍNEAS	58
4. ANALÍTICA SANGUÍNEA	59
4.1. Hemograma	59
4.1.1. Glóbulos rojos	60
4.1.2. Hematocrito	60
4.1.3. Hemoglobina.....	60
4.1.4. Índices eritrocitarios	60
4.1.5. Ancho de distribución de los glóbulos rojos	61
5. EXAMEN DEL FROTIS SANGUÍNEO	61
6. RECUENTO DE RETICULOCITOS	62
7. ANALÍTICA DEL PLASMA SANGUÍNEO	62
7.1. Lactato deshidrogenasa	62
7.2. Bilirrubina total	63
7.3. Hierro	63
7.4. Alanina aminotransferasa	63
7.5. Aspartato aminotransferasa.....	63
7.6. Fosfatasa alcalina	64
7.7. Urea	64
7.8. Creatinina	64
7.9. Proteína total.....	64
7.10. Albúmina.....	65
8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	65
9. INSTALACIONES.....	66

RESULTADOS 67

1. PESO.....	69
2. PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS	69
2.1. Glóbulos rojos.....	69
2.2. Hematocrito	70
2.3. Hemoglobina	70
2.4. Reticulocitos	71
2.5. Volumen corpuscular medio.....	71
2.6. Ancho de distribución de los glóbulos rojos	71
2.7. Hemoglobina corpuscular media	72
2.8. Concentración de hemoglobina corpuscular media	72

3. PARÁMETROS BIOQUÍMICOS.....	73
3.1. Lactato deshidrogenasa	73
3.2. Bilirrubina total	73
3.3. Hierro	74
3.4. Alanina aminotransferasa	74
3.5. Aspartato aminotransferasa	75
3.6. Fosfatasa alcalina.....	75
3.7. Urea	76
3.8. Creatinina	76
3.9. Proteína total.....	76
3.10. Albúmina.....	77
4. EXTENSIONES SANGUÍNEAS	77
TABLAS	79
GRÁFICAS	103
IMÁGENES.....	115
DISCUSIÓN	121
1. ELECCIÓN DEL MODELO EXPERIMENTAL.....	123
2. ELECCIÓN DEL OXIDANTE.....	124
3. ELECCIÓN DE LA VÍA DE ADMINISTRACIÓN Y LA DOSIS.....	124
4. ELECCIÓN DE LOS PARÁMETROS A INVESTIGAR.....	126
4.1. Peso	127
4.2. Parámetros hematológicos	129
4.2.1. Glóbulos rojos	129
4.2.2. Hematocrito	132
4.2.3. Hemoglobina.....	135
4.2.4. Reticulocitos	139
4.2.5. Volumen corpuscular medio	142
4.2.6. Ancho de distribución de los glóbulos rojos	145
4.2.7. Hemoglobina corpuscular media	146
4.2.8. Concentración de hemoglobina corpuscular media	148
4.3. Parámetros bioquímicos	150
4.3.1. Lactato deshidrogenasa	151

4.3.2. Bilirrubina total	152
4.3.3. Hierro	153
4.3.4. Alanina aminotransferasa	155
4.3.5. Aspartato aminotransferasa	156
4.3.6. Fosfatasa alcalina	157
4.3.7. Urea	158
4.3.8. Creatinina.....	159
4.3.9. Proteína total	160
4.3.10. Albúmina	161
CONCLUSIONES	163
RESUMEN	167
SUMMARY	171
BIBLIOGRAFÍA	175

Introducción

El vocablo anemia deriva de la palabra griega "ἀναιμία" y significa literalmente "carencia de sangre" (Real Academia Española, 2001). Clínicamente se define como "bajo nivel de hemoglobina en sangre", ya sea por un descenso del número de eritrocitos, su volumen y/o contenido de hemoglobina de los mismos (Voigt, 2003). No es una enfermedad en sí, sino un signo clínico de un proceso patológico subyacente.

La anemia hemolítica es un trastorno caracterizado por la destrucción prematura de los hematíes debido a múltiples causas como infecciones, trastornos autoinmunes, hereditarios, ciertos medicamentos y, en nuestro caso, agentes oxidantes.

El eritrocito posee un metabolismo que le garantiza la protección contra los agentes oxidantes. Durante la exposición a un agente tóxico capaz de generar radicales de oxígeno, la cantidad de glucosa que se metaboliza a través de la vía de la hexosa-monofosfato aumenta; de esta forma se regenera el glutatión reducido y se protege de la oxidación al grupo hemo, a los grupos sulfhidrilo de la globina y a la membrana; ahora bien, si la acción del agente oxidante es muy intensa, superando la capacidad metabólica del hematíe, aparecen los efectos nocivos o perjudiciales como la metahemoglobinemia (por oxidación del grupo hemo), la precipitación de la globina (con formación de cuerpos de Heinz) o la peroxidación de los lípidos de membrana celular.

Estos fenómenos derivados de la oxidación de algún componente del hematíe hacen que la principal función de éste, que es el transporte de oxígeno a los tejidos, se vea comprometida y que se traduzca en una disminución del número de glóbulos rojos, del hematocrito y/o de la hemoglobina dando lugar a una anemia hemolítica.

En la anemia hemolítica por oxidación los eritrocitos pueden ser eliminados prematuramente de la circulación por los macrófagos del bazo y del hígado (hemólisis extravascular), siempre que los hematíes resulten lesionados o se vuelven menos deformables o, al romperse su membrana durante su tránsito por la sangre (hemólisis intravascular).

La oxidación de los glóbulos rojos es producida por numerosos agentes oxidantes en diferentes especies, entre los que se encuentran la cebolla por su contenido en

n-propil tiosulfato sódico (Spice, 1976), el acetaminofeno (Savides et al., 1984), el azul de metileno (Schechter et al., 1973), la vitamina K3 o menadiona (Fernández et al., 1984) o el zinc (Gurnee y Drobatz, 2007).

En nuestra investigación hemos elegido la fenilhidracina como agente oxidante ya que, una vez revisada la bibliografía existente, se utiliza para la inducción de anemia hemolítica y el estudio de su mecanismo en multitud de especies: rata (Yeshoda, 1942; Berger, 1985), ratón (Golab et al., 2002), perro (Brock et al., 1989), ternera (Sharma et al., 1991), conejo (Hoppe-Seyler, 1885; Xie, 2003), pollo (Datta et al., 1990), pato (Rigdon, 1953), rana (Twersky et al., 1995) y trucha arco iris (McClelland et al., 2005).

Tradicionalmente se han utilizado como modelos experimentales para el estudio de la anemia hemolítica los perros o dentro del grupo de los denominados animales de experimentación, la rata, el ratón y el conejo. En nuestro caso, hemos elegido el jerbo como biomodelo dada la particularidad de su sistema hematopoyético que se caracteriza por tener una vida media muy corta de sus glóbulos rojos circulantes. Los tiempos medios de supervivencia de los hematíes determinados con el Cr^{51} son de 9,9 días (Womack, 1972), 8-13,7 días (Dillon y Glomski, 1975) y 9,4-10,5 días (Rosa y Glomski, 1981), lo que nos permitirá realizar el estudio en menor tiempo que si se utiliza cualquier otra especie, ya que se considera una especie homogénea genéticamente, de manera que los resultados obtenidos en los experimentos suelen ser más significativos que en otras especies con una menor homogeneidad genética. La repetibilidad de los resultados de un experimento utilizando la misma cepa de jerbo es muy alta (Robinson, 1975).

Objetivos

La fenilhidracina es el agente oxidante más utilizado para provocar anemia hemolítica en los animales de experimentación.

El jerbo es una especie especialmente interesante para estudios hematológicos ya que los tiempos medios de supervivencia determinados con el Cr^{51} de sus eritrocitos son de 9,9 días (Womack, 1972), 8-13,7 días (Dillon y Glomski, 1975) y 9,4-10,5 días (Rosa y Glomski, 1981), encontrándonos con una eritropoyesis especialmente intensa no comparable con otros animales de experimentación.

Nuestros objetivos son:

1. Provocar una anemia hemolítica en el jerbo (*Meriones unguiculatus*) mediante el uso de un agente oxidante (fenilhidracina).
2. Determinar la mínima dosis necesaria y la pauta de administración de la fenilhidracina para provocar la anemia.
3. Estudiar los parámetros basales, tanto hematológicos como bioquímicos, de esta especie y su variación a lo largo del proceso hemolítico y su posterior recuperación.

Revisión Bibliográfica

1. EL JERBO DE MONGOLIA

El jerbo de Mongolia (*Meriones unguiculatus*), se admite el término gerbo, es un roedor caracterizado por un comportamiento monógamo, mecanismos eficaces de utilización del agua y ataques epilépticos espontáneos (Harkness y Wagner, 1995).

El interés en la utilización de este animal en experimentación animal como modelo de enfermedades radica fundamentalmente en estudios relacionados con neurología, otorrinolaringología, oftalmología, parasitología, metabolismo de lípidos y envejecimiento (Pagoaga, 1991).

1.1. ORIGEN

Se encuentran en libertad en los desiertos y zonas semiáridas de China, Mongolia, oeste y centro de Asia, India, norte de África y este de Europa (Field y Sibold, 1999). Es un animal limpio, relativamente inodoro, de naturaleza curiosa, fácil de manejar y de relativa reciente introducción en el campo de la experimentación animal (Norris, 1987).

1.2. TAXONOMÍA

Los jerbos o gerbillos son pequeños roedores mamíferos pertenecientes al género *Meriones*, el cual incluye 14 especies. Su primera descripción se remonta a la realizada por Illger en 1811.

La clasificación taxonómica actual es la siguiente (Chen, 2000):

Reino	ANIMALIA
Filo	CHORDATA
Subfilo	VERTEBRATA
Clase	Mammalia
Orden	Rodentia
Suborden	Sciurognathi
Familia	Muridae
Subfamilia	Gerbillinae
Género	<i>Meriones</i>

En la subfamilia Gerbillinae, además del género *Meriones*, se incluyen otros tres: *Gerbillus*, *Tatera* y *Taterillus*, (Chaworth-Musters y Elleman, 1947).

Robinson (1975) en trabajos anteriores expuso la clasificación de Lay, basada en datos no publicados y que incluía a los jerbos dentro de la familia Muridae, aunque Simpson (1945) los había clasificado dentro de la familia Cricetidae. Norris (1987) los clasificó dentro del suborden Myomorpha, mayoritario dentro del orden Rodentia.

En la actualidad han sido descritas aproximadamente unas 100 especies de jerbos (Clark, 1984) cuyo tamaño varía entre un ratón y una rata, y entre ellas se pueden encontrar: *Meriones shawi*, *Meriones libycus*, *Meriones persicus*, *Gerbillus amoenus*, *Gerbillus pyramidum* y *Meriones unguiculatus* (Field y Sibold, 1999).

De entre ellas, la más utilizada en experimentación es el *Meriones unguiculatus* (jerbo de Mongolia), cuya primera identificación tuvo lugar en 1867 por Milne-Edwards y fue confirmada en 1947, en una revisión del género, por Chaworth-Musters y Ellerman. Dentro de esta especie se contemplan otras cuatro subespecies de las que derivan los jerbos que actualmente se utilizan en experimentación y como animales domésticos (Robinson, 1975).

En experimentación animal, el *Meriones unguiculatus* es el único miembro de la Familia Gerbillinae disponible en Europa y Estados Unidos (Laber-Laird, 1996). Estos jerbos derivan de 20 parejas capturadas en 1935 por el Dr. Kasuga en las orillas del río Amur en Mongolia, mantenidos y cruzados en colonia cerrada en el Instituto Kitasato de Japón, de donde se recogieron animales que se llevaron a los Laboratorios Centrales para Animales de Experimentación de Tokio en 1949 (Norris, 1987), formándose una subcolonia de la que posteriormente, en 1954, el Dr. Schwentker importó 11 parejas a la granja Tumblebrook (EEUU), creándose así el centro de distribución de estos animales para Estados Unidos. Posteriormente, en 1961-62, se estableció una subcolonia de 7 parejas en la Worcester Foundation for Experimental Biology, Shrewsbury (Massachusetts). En 1964, Marston importó 12 parejas desde Estados Unidos a la Universidad de Birmingham (Gran Bretaña), formándose así la primera colonia europea a partir de la cual comenzó la distribución y uso de este animal en los laboratorios de Europa (Norris, 1987).

1.3. CARACTERÍSTICAS ANATÓMICAS

El jerbo posee unas características físicas intermedias entre la rata y el hámster (Pagoaga y Domínguez, 1991).

El peso varía individualmente y entre distintas colonias. La dieta es un factor determinante en el peso (Harkness y Wagner, 1995), siendo éste entre 65 y 100 g, aproximadamente un 5% más según lo publicado por Robinson (1979). A los 3 meses de edad llegan al 70% de su peso adulto que finalmente es alcanzado a los 15-18 meses (Arrington et al., 1973). El peso de estos animales sufre un incremento progresivo desde el destete hasta la semana 24 a partir de la cual se estabiliza; entre las semanas 6 y 24 el aumento del peso es significativamente mayor en los machos que en las hembras (Cano Rábano et al., 1999-2000). Una vez alcanzado el peso final, el de los machos es ligeramente mayor que el de las hembras (Cheal, 1986).

El tamaño varía entre los 10 y 15 cm. La cola representa el 45% de la longitud total del animal (Pagoaga y Domínguez, 1991) y está completamente cubierta de pelo; los ojos son grandes, oscuros y prominentes, con una abertura infraorbital dividida y sin apófisis postorbital; el sistema visual de los jerbos está bien adaptado para una visión detallada durante la vida diurna (Baker y Emerson, 1983). La cabeza es grande si la comparamos con el resto del cuerpo. Las orejas son pequeñas, bien desarrolladas y cubiertas de pelo (Clark, 1984).

El color de la piel es negro. La capa habitual es el agutí, con la punta de la cola negra (Cramlet y Jones, 1974), existiendo una variedad blanca y otra negra; la negra presenta frecuentemente rayas o manchas blancas desde la barbilla al pecho y manchas blancas en los pies (Harkness y Wagner, 1995). Recientemente se han desarrollado animales con mutaciones que han originado capas pío, canela y gris (West, 1999). El mutante gris ha sido descrito por Leiper y Robinson (1985). También se han descrito colonias de individuos albinos debido a una mutación que, a diferencia de otras especies del mismo género, no muestran ni reducción de su esperanza de vida, ni de la fertilidad, ni una mayor susceptibilidad a padecer diabetes mellitus (Shaham et al., 1978). Swanson (1980) describió una nueva variedad sin pelo que presenta alteraciones a nivel del timo. Se ha sugerido la posibilidad de una relación entre los genes que determinan la capa y la susceptibilidad del jerbo a padecer ataques epilépticos (Gray-Allan y Wong, 1990), así como las preferencias sociales de las hembras (Wong et al., 1990). Así mismo, se ha demostrado la relación entre el

color del pelo y el marcaje, siendo más frecuente en los jerbos con pelaje más oscuro (Turner y Carbonell, 1984).

Las bullas timpánicas están muy desarrolladas, con una gran capacidad para captar sonidos (Lay, 1972) de 3000 Hz o menos (Rosowski et al., 1999), siendo utilizado como biomodelo en determinados estudios relacionados (Hessel et al., 1997).

La dentadura presenta la fórmula 1-0-0-3 tanto para la mandíbula superior como para la inferior, con un total de 16 piezas dentales, de las cuales los molares tienen cúspides y relieve laminar o prismático (Field y Sibold, 1999).

Las patas traseras presentan cinco dedos y son alargadas, lo que permite al animal mantenerse en posición erguida. Las delanteras son más cortas, pero tienen cuatro dedos que acaban en fuertes garras, lo que les da movilidad para sujetar el alimento, así como para cavar y horadar el terreno (Pagoaga y Domínguez, 1991).

Las hembras poseen cuatro pares de mamas: dos inguinales y dos torácicas, y su uretra se abre al exterior fuera de la vagina (Williams, 1974).

El jerbo posee, en una zona alopecica de la región media abdominal, una estructura glandular sebácea, ovalada y única en el área ventral de la región media abdominal denominada glándula sebácea ventral. Está bajo el control de hormonas gonadales y su misión es marcar el territorio (Yahr, 1977) y las crías (Harkness y Wagner, 1995; Wallace et al., 1973), ya que al rozar contra determinados sitios depositan una secreción formada por ésteres de colesterol, ácido fenilacético y ácidos grasos (Jacob y Green, 1977). Ésta glándula es aproximadamente el doble de grande en los machos, ya que marcan con mucha más frecuencia que las hembras (Thiessen et al., 1973), limitándose el marcaje de éstas a la gestación y la lactancia. Se asocia a un aumento de la agresividad (Wallace et al., 1973), por lo que se deduce que el marcaje es un comportamiento andrógeno-dependiente (Arkin et al., 2003). Según Arkin et al. (1999) este comportamiento empieza a observarse a partir de los 19/22 días de edad. A los 40 días en los machos y a los 50 en las hembras, empieza a apreciarse la glándula como una pequeña protuberancia, es decir, el comportamiento de marcaje se manifiesta incluso durante el periodo en que la glándula ventral todavía no se ha desarrollado. Esta glándula también ha sido relacionada con el potencial reproductivo (Yahr, 1979) presentándose los niveles más bajos de marcaje en los machos alojados

individualmente o en los machos subordinados, seguidos por los machos expuestos a hembras ovariectomizadas, y los machos dominantes de una pareja; los niveles más altos de marcaje ocurren en machos vasectomizados que viven con hembras intactas (Pendergrass et al., 1989). El comportamiento de marcaje en el jerbo de Mongolia es un comportamiento innato y no aprendido (Arkin et al., 2000).

La capacidad de termorregulación es superior a la de la mayoría de los roedores desérticos, lo que le permite estar activo en los momentos más calurosos del día (Robinson, 1979). Esta función está regulada por la glándula de Harder, situada por detrás del canto medial del ojo (Laber-Laird, 1996), llegando su secreción a las fosas nasales gracias al parpadeo. La secreción está formada por pigmentos, mayoritariamente protoporfirina, y lípidos, fundamentalmente ácidos grasos primarios derivados de los 2,3 alcanodiol diacil ésteres. La secreción se mezcla con la saliva y es esparcida por toda la superficie del animal durante el acicalamiento (Thiessen, 1988). Los lípidos y pigmentos aíslan al jerbo del frío y la humedad, alterando la reflexión de la energía radiante sobre el pelaje, según Pendergrass y Thiessen (1981) alterando la radiación, pero no la conducción ni convección del calor, lo que sugiere que es una adaptación especial a la radiación solar. Se ha comprobado que los jerbos harderianectomizados tienen reducida la capacidad para resistir el frío y la humedad (Thiessen y Kittrell, 1980). El peso de la glándula en los machos es de unos 182 mg y en hembras de 169 mg, sin presentar dimorfismo sexual (Pagoaga y Domínguez, 1991). En su hábitat natural soporta variaciones extremas de temperatura, por lo que ha desarrollado varios mecanismos que le permiten alterar su potencial termoenergético metabólico adaptándose al calor durante el día y al frío durante la noche (Steffen y Roberts, 1977). Además, modifican sus ritmos de actividad circadiana colocándose al sol durante las horas diurnas en invierno y haciéndose nocturnos en verano manteniendo, de esta forma, su temperatura estable para ser activos durante todo el año (Pagoaga y Domínguez, 1991).

En los primeros días de vida son incapaces de mantener la temperatura corporal; el paso de poiquilotermos a homeotermos se logra a partir del día 19 (Schneider et al., 1995).

Comparando la tolerancia a temperaturas extremas del jerbo con el ratón, el jerbo resulta más tolerante (Oufara et al., 1987 y 1988). Con las bajas temperaturas los jerbos incrementan los lípidos de su pelaje y lo oscurecen mientras que a

temperaturas altas la cantidad de secreción depositada es menor y el pelo tiende a aclararse. Es parte de un comportamiento etológico ya que con el calor aumenta la frecuencia de baños de arena, lo que reduce la cantidad de lípidos sobre el pelaje (Thiessen, 1988). Existe un aumento de la secreción en los machos para estimular a la hembra en el apareamiento (Thiessen y Harriman, 1986).

El timo está localizado en el tórax y persiste en la madurez (Williams, 1974).

La vascularización cerebral del jerbo presenta el polígono de Willis incompleto, sin conexiones arteriales entre el sistema basilar y el carotídeo (Levine y Sohn, 1969), lo que provoca que una oclusión arterial bilateral produzca una isquemia cerebral completa. Esta vascularización tan característica ha dado lugar a su utilización como biomodelo para el estudio del infarto cerebral (Ginsberg y Busto, 1989; Castro-Pacheco et al., 2001).

El estudio de la función adrenal y la secreción de mineralocorticoides es otra de las utilidades del jerbo como modelo de experimentación (Fenske, 1990). El cociente entre el peso de la glándula adrenal y el peso corporal es uno de los mayores conocidos, siendo tres veces mayor que en el caso de la rata (Lorentzon et al., 1984), o incluso cuatro veces mayor (Clark, 1984). La secreción primaria de esta glándula es el cortisol (19 α -hidrocortisterona) en lugar de la corticosterona, al igual que en la glándula humana y a diferencia de lo que ocurre en otros roedores (Cheal, 1986). La ultraestructura es única, apareciendo a los 42 días del nacimiento unas células con espiras concéntricas de retículo endoplasmático rugoso localizadas en una banda estrecha en el borde de la zona fascículo-reticular (Fenske, 1986 y 1987). La secreción de mineralocorticoides es muy diferente a la observada en otros roedores y parece estar más influenciada por la estimulación de la hormona adrenocorticotropa o de la lisina-vasopresina que por el contenido en sodio de la dieta (Fenske, 1990).

Los riñones del jerbo se caracterizan por poseer unas nefronas muy eficientes, perfectamente adaptadas a su hábitat natural, con gran capacidad para concentrar la orina y conservar el peso corporal incluso en casos de escasez de agua (Kutscher, 1969). En condiciones de deshidratación, la relación entre la osmolaridad de la orina y la del plasma es mucho mayor en el jerbo que en la rata de agua o en la rata Brattleboro (Natochin et al., 1983). Para reducir la gravedad de la deshidratación en

privación de agua el jerbo reduce la cantidad de proteína ingerida en la dieta (Edwards et al., 1983).

1.4. HEMATOLOGÍA

Las primeras referencias fueron aportadas por Mays (1969) describiendo dimorfismo sexual en el volumen del paquete celular, niveles de hemoglobina, número de linfocitos circulantes y recuento total de leucocitos. Más adelante se corroboran esas diferencias en el valor del hematocrito, hemoglobina y volumen corpuscular medio pero no en los recuentos y porcentajes de las diferentes poblaciones de leucocitos (Cano Rábano et al., 1999).

Es destacable la elevada concentración de reticulocitos y eritrocitos con punteado basófilo (Termer y Glomski, 1978). Ese punteado basófilo se debe a la presencia de ribosomas agregados en los reticulocitos y en los eritrocitos jóvenes (Jain, 1993). Los reticulocitos son eritrocitos inmaduros, ligeramente mayores que el eritrocito maduro, sin núcleo, pero que aún contienen ARN ribosómico, necesario para la síntesis de hemoglobina, consecuencia del corto tiempo medio de supervivencia de sus eritrocitos determinados con el Cr^{51} en 9,9 días (Womack, 1972), 8-13,7 días (Dillon y Glomski, 1975) y 9,4-10,5 días (Rosa y Glomski, 1981). Las células más numerosas de la médula ósea son los heterófilos o neutrófilos pseudoeosinofílicos (39%), los normoblastos (27%) y los linfocitos (8%) (Weeks y Glomski, 1978).

Cano Rábano et al. (1999), encontraron los siguientes resultados al analizar sangre de 60 jerbos macho y 60 hembras, con edades comprendidas entre 6 y 8 meses:

Parámetro	Machos	Hembras	Grado de significación
Eritrocitos ($10^6/\mu\text{l}$)	9,70	9,54	NS
Leucocitos ($10^3/\mu\text{l}$)	9,11	8,78	NS
Hemoglobina (g/dl)	16,06	14,94	$P < 0,0001$
Hematocrito (%)	48,98	45,35	$P < 0,0001$
Volumen Corpuscular Medio (fl)	50,33	46,76	$p < 0,05$
Hemoglobina Corpuscular Media (pg)	16,49	16,54	NS
Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media (g/dl)	32,95	33,10	NS

1.5. BIOQUÍMICA

Pocos han sido los autores que han estudiado este punto. Los valores con los que contamos se remontan a los publicados por Mays en 1969 y que han sido utilizados, posteriormente, como referencia por otros. Cabe indicar al respecto que los valores descritos son similares a los del resto de los roedores (Clark, 1984; Harkness y Wagner, 1995).

Parámetro (valores plasmáticos)	Valor medio	Valor mínimo	Valor máximo
Fósforo (mg/dl) machos	5,94	4,7	7,0
hembras	4,88	3,7	6,5
Sodio (mEq/l)	150,90	141	171,5
Potasio (mEq/l)	4,54	3,3	6,3
Fosfatasa alcalina (U/l)	218,56	106,48	556,93
BUN (mg/dl)	20,88	16,8	31,6
Creatinina (mg/dl)	0,88	0,5	1,4
Proteínas (g/dl)	7,9	4,8	16,8
Albúmina (g/dl)	3,08	1,8	5,8
Globulinas (g/dl)	4,83	0,6	14,3
Glucosa (mg/dl)	93,78	40	140,7
Ácido úrico (mg/dl) machos	1,91	1,1	2,8
hembras	1,36	1,1	2

(Mays, 1969)

Boquist y Fahraeus (1975) publicaron los valores de calcio (10,2 mg/dl) y de fósforo (4,8 mg/dl). Los de colesterol ($6,05 \pm 0,57$ mmol/l) y de creatinina ($0,49 \pm 0,13$ mg/dl) fueron reseñados por Wasan et al. (2001).

Los machos adultos de esta especie presentan una elevada lipemia (Percy y Barthold, 1993), seguramente debida a la dieta (Harkness y Wagner, 1995). Las dietas comerciales para animales de laboratorio provocan en jerbos más casos de lipemia y colesterol sérico elevado que en otras especies de roedores (Andersen y Holub, 1982), probablemente debido a que, por ejemplo, los jerbos muestran una mayor sensibilidad al colesterol que las ratas (Cheal, 1986).

Según Illera et al. (1993) existen diferencias en algunos parámetros bioquímicos y hematológicos en función de la edad, siendo más significativas en el caso de la hemoglobina, creatinina (0,70 mg/dl en jerbos adultos frente a 0,55 mg/dl en animales jóvenes), potasio y calcio plasmático ionizado (valores en jóvenes de 0,7 mmoles/l y en adultos de 0,54 mmol/l).

Nuestro grupo de trabajo (Cano et al., 2001) ha medido los valores normales, los máximos y los mínimos así como el rango de variación de diversos parámetros de bioquímica plasmática. El estudio se realizó en animales con edades comprendidas entre los 2,5 y los 11 meses de edad.

Parámetro (valores plasmáticos)	Valor medio	Valor mínimo	Valor máximo
Calcio (mg/dl)	9,72	8,4	11
Fósforo (mg/dl)	8,71	5,07	13,57
Magnesio (mmol/l)	1,28	1,06	1,66
Fosfatasa alcalina (U/l)	218,56	106,48	556,93
Proteínas (g/dl)	6,69	6,01	7,87
Urea (mg/dl)	58,85	37,5	77,5
Creatinina (mg/dl)	0,59	0,37	0,84

1.6. PATOLOGÍA ESPONTÁNEA

El jerbo sufre frecuentemente ataques epilépticos que varían en intensidad desde moderados a severos en función de factores genéticos, dietéticos y ambientales (Cheal, 1986). Los ataques comienzan a aparecer a los dos meses de edad hasta alcanzar una incidencia del 40 al 80% dentro de los miembros adultos de la colonia. La recuperación es rápida y vuelve a la actividad normal en pocos minutos (Pagoaga et al., 1991). Se ha planteado la hipótesis que el fin de las convulsiones es hacer desistir a los depredadores (Laber-Laird, 1996). Aparentemente esta epilepsia es hereditaria y puede perpetuarse o eliminarse de una población utilizando esquemas genéticos de selección, por lo que se han conseguido líneas genéticas de individuos no sensibles a los ataques. Se ha descrito que los animales albinos presentan una menor susceptibilidad a padecer estos ataques (Robbins, 1976).

Con cierta frecuencia presenta diabetes y obesidad espontánea si es alimentado con dietas comerciales estándar, enfermedades periodontales a partir de los 6 meses de

edad, hiperadrenocorticismo espontáneo, hiperglucemia, hiperplasia pancreática, hiperlipidemia y degeneración vascular (Vincent et al., 1979).

En 1995, Bingel, estudió una colonia de jerbos en la que la que destacó lesiones renales como la amiloidosis, la glomerulosclerosis, la nefritis intersticial y la nefrosis tubular, y hepatocelulares, como la degeneración y la necrosis hepatocelular.

Otros procesos que pueden encontrarse de manera espontánea en animales viejos son las neoplasias, que no suelen producir metástasis, siendo más frecuentes las de tejido ovárico, cutáneo, renal, hepático y esplénico (Vincent et al., 1979).

También puede desarrollar enfermedades bacterianas, fúngicas y parasitarias comunes a otros roedores (Laber-Laird, 1996).

1.7. MANEJO

Son animales fáciles de manejar ya que raramente muerden o se resisten. Un jerbo que no está acostumbrado al contacto humano es mucho más difícil de manejar (Laber-Laird, 1996). Harkness y Wagner (1995) afirma que los animales viejos muerden más fácilmente que los jóvenes o las parejas de adultos.

Son animales muy curiosos y si se escapan son fáciles de capturar ya que en vez de esconderse tienden a explorar el lugar. La mejor forma de coger a un jerbo de la jaula es colocando ambas manos en forma de copa por debajo del animal y levantarlo suavemente en la palma (Field y Sibold, 1999). Se puede sujetar al jerbo por la base de la cola (nunca por el extremo ya que la piel se desprende con gran facilidad) y agarrando simultáneamente un pliegue de piel de la espalda (Harkness y Wagner, 1995). No es necesario el uso de guantes, pero pueden morder si el manejo es demasiado frecuente o inadecuado (Marston, 1976), o si se les manipula con el fin de inyectarles durante muchos días (Norris, 1987).

Hay que tener en cuenta la susceptibilidad del jerbo a padecer ataques epilépticos durante el manejo (Cheal, 1986).

1.8. ACTIVIDAD

La mayor parte de las especies de jerbos presentan actividad predominantemente nocturna pero algunas son exclusivamente diurnas (Lay, 1972). El jerbo de Mongolia es considerado diurno con tendencia crepuscular si se encuentra en su estado natural, pero en el laboratorio puede ser activo durante el día, el crepúsculo y la noche (Marston, 1976). Nelissen y Nelissen Joris (1975) afirma que, tanto en cautividad como en su medio natural, es un animal que presenta mayor actividad durante la noche. Para Pietrewicz (1982), el jerbo de Mongolia en condiciones naturales es un animal crepuscular, con un pico de actividad entre las 6:00-8:00 y las 18:00-20:00 horas sin haber diferencias de sexo. Sin embargo, Klaus et al. (2000) mantienen la hipótesis de que el jerbo es un animal con actividad principalmente nocturna si no está influenciado por las actividades humanas en el laboratorio, ya que como señalaron Thiessen y Harriman (1986) si se le da a elegir prefiere la oscuridad y las crisis epilépticas son más frecuentes de noche. Diez Prieto y García Rodríguez (1999) describieron que esta especie presenta breves periodos de intensa actividad seguida de periodos, también breves, de reposo o sueño, tanto de día como de noche. Refinetti et al. (1999) realizaron un estudio con 8 especies de mamíferos (4 nocturnos y 4 diurnos), en el cual el jerbo fue la única especie que no presentó una acrofase definida.

Presentan patrones de limpieza y acicalamiento siempre en el mismo orden: nariz, cara, orejas, costados, vientre y cola. Thiessen et al. (1983) describen una relación entre la frecuencia de acicalamiento, la termorregulación y la comunicación química.

La temperatura provoca una marcada influencia en el ritmo circadiano (Weinert et al., 2003).

1.9. ALOJAMIENTO

Se adapta con facilidad a diferentes condiciones de alojamiento facilitando su mantenimiento en centros de investigación (Norris, 1987). Además se cría sin dificultad en animalarios ya que es un animal sociable y poco oloroso (Diez Prieto y García Rodríguez, 1999). En cautividad presenta diferencias en el desarrollo, comportamiento y morfología endocrina comparándolo con el jerbo en libertad (Clark y Galef, 1985).

Viven una media de 1146 días las hembras y 1062 días los machos (Arrington et al., 1973). El macho más longevo vivió 1464 días. En cautividad, su esperanza de vida oscila entre dos y cuatro años, siendo algo mayor en las hembras (Pagoaga y Domínguez, 1991).

Para su alojamiento pueden utilizarse jaulas de polipropileno con cubierta metálica, bebederos con boquilla de acero inoxidable y demás accesorios utilizados para el alojamiento de roedores en general (Frenkel et al., 1972).

La altura de las jaulas debe ser la suficiente para que el animal pueda erguirse sobre sus patas traseras (Pagoaga et al., 1991). The Universities Federation of Animal Welfare (UFAW), recomienda la utilización de jaulas de 15 cm de altura y que aseguren un mínimo de 100 cm² de superficie por animal (Laber-Laird, 1996). La superficie sugerida para parejas destinadas a la reproducción y sus crías es de 700-900 cm² (Norris, 1987), sugiriendo otros autores como Harkness y Wagner (1995) 230 cm² por animal adulto y 1300 cm² para las jaulas de cría. Las jaulas deben poseer un cierre de seguridad para evitar la fuga, ya que son saltadores activos y pueden escapar (Clark, 1984).

Si los animales son agrupados antes de la pubertad no aparecen problemas de agresividad entre ellos, en cambio, si se juntan animales adultos habrá luchas por conseguir la dominancia (Clark, 1984). Los jerbos emparejados después de alcanzar la pubertad o después de una separación prolongada suelen pelear lo que se reduce si los animales son sometidos a una anestesia ligera y se recuperan ambos en una jaula neutral (Harkness y Wagner, 1995). Cuando una hembra adulta pierde a su pareja es prácticamente imposible que acepte a otro macho (Marston y Chan, 1965). Scheibler et al. (2004) describen dos posibles causas de brotes de agresividad dentro de una familia estable, los cambios en la estructura familiar y la competición reproductiva entre las hembras, lo cual implica que la existencia de tríos reproductivos también es dificultosa.

En estado salvaje excava túneles y cámaras para dormir y almacenar alimento por lo que el comportamiento de excavar con las patas el suelo en las esquinas de la jaula es un comportamiento normal en los jerbos (Harkness y Wagner, 1995).

Según Norris (1987), la cama debe tener un grosor de 2 centímetros como mínimo, estar limpia, seca, ser absorbente y no abrasiva, como por ejemplo serrín o viruta. Cuando el pelaje del animal se vuelve seco y apelmazado es recomendable proporcionar a la jaula algún material arenoso para que pueda darse baños de arena y regular así la cantidad de grasa de su pelo (Laber-Laird, 1996).

Es más fácil mantener la cama en buenas condiciones que en el resto de roedores ya que las cantidades de orina y heces que elimina el animal son escasas (Marston, 1976). Las jaulas deben lavarse con agua caliente, detergente, desinfectante y aclararse (Harkness y Wagner, 1995).

En cuanto a los requerimientos ambientales, el jerbo en estado salvaje puede sobrevivir en condiciones extremas, siendo su temperatura óptima los 20-22°C según Marston (1976) y 15-24°C según Norris (1987) y West (1999).

La humedad ambiental debe ser más baja que la utilizada para otro tipo de roedores debido a las condiciones de su hábitat natural (Laber-Laird, 1996). La humedad ambiental debería estar entre el 30-50% (Harkness y Wagner, 1995). Según Loew (1984), una humedad por encima del 50% provoca un mayor acicalamiento del pelaje del animal, lo que puede ocasionar problemas dermatológicos como dermatitis nasal. Robinson (1975) recomienda mantener niveles de humedad por debajo de esta cifra.

El fotoperiodo debe mantenerse en ciclos de 14-10 horas o el más común de 12-12 horas (Norris, 1987), condiciones bajo las cuales el jerbo no muestra variaciones significativas en su actividad entre los periodos de luz y oscuridad, mostrando solo un ligero incremento durante la transición entre ambas fases (Susic y Masirevic, 1986). Los jerbos expuestos a fotoperiodos cortos (10-14) tienen menor peso corporal y menor desarrollo de sus órganos sexuales (Petterborg, 1984). El fotoperiodo influye también en procesos de maduración, como por ejemplo el inicio de la alimentación sólida, la apertura de los ojos, la abertura vaginal y la edad del primer parto, todos ellos en relación con el peso corporal (Pagoaga y Domínguez, 1991).

1.10. ALIMENTACIÓN

Está adaptado para sobrevivir largos periodos de tiempo sin el consumo de agua, ya que al igual que otros roedores desérticos, es capaz de satisfacer sus necesidades con el agua contenida en los alimentos que ingiere (Norris, 1987), hecho demostrado por

Meckey y Ginther (1972) que mantuvieron colonias suministrándoles únicamente una ración diaria de vegetales frescos. Mientras el animal está sometido a condiciones de escasez de agua cesa la función reproductora (Yahr y Kessler, 1975).

Administrándoles agua ad libitum consumen 4 ml/100 g peso vivo al día (Arrington y Ammerman, 1969) aunque para el mantenimiento de su peso basta con 2 ml/100 g/día. Sin embargo si se impide el acceso del animal al agua pierde hasta un 16% (Kutscher, 1969) o un 17% del peso (Boice y Witter, 1970).

En casos de privación de agua, la pérdida de peso por parte de las hembras es mayor a la de los machos (Edwards, 1991).

En cuanto a la alimentación, los jerbos son granívoros o herbívoros, en estado salvaje se alimentan de semillas en la estación seca, y en la época de lluvia suman a su dieta distintos tipos de vegetales (Laber-Laird, 1996).

Consumen de 5 a 8 g/día de comida, aunque en casos de difícil acceso a la misma pueden aumentar la ingestión de alimentos (Forkman, 1995). En los centros de investigación y animalarios se adaptan muy bien a las diferentes dietas comercializadas para roedores (aproximadamente 22% de proteína) y comienzan a ingerirlas entre las 2 y 3 semanas de edad (Pagoaga et al., 1991). Según Hartmann et al. (1995) los piensos pueden humedecerse para los animales recién destetados. Entre las 4 y las 7 semanas la ganancia de peso es de 1 g/día aproximadamente.

Es posible suplementar las dietas comerciales con distintas frutas, vegetales o pipas de girasol una o dos veces por semana (Norris, 1987), sin embargo las pipas de girasol pueden inducir depósitos grasos en distintos órganos y aumentar los niveles séricos de colesterol y triglicéridos (Leach y Holub, 1984), pero no aterosclerosis (Harkness y Wagner, 1995). Incluso con dietas estándar, con 4-6% grasas, los jerbos desarrollan lipemia (Harkness y Wagner, 1995).

Son resistentes a las deficiencias vitamínicas (Laber-Laird, 1996). La dieta debe complementarse con los aminoácidos valina, colina y taurina, y los animales en crecimiento también con arginina (Otken y Hall, 1980). Hay que tener en cuenta que a medida que el animal envejece el consumo de alimento decrece considerablemente,

y que al igual que otros roedores tienen tendencia a la obesidad (Otken y Scott, 1984).

No es coprófago a no ser que se le administre una dieta inadecuada (Otken y Scott, 1984).

1.11. REPRODUCCIÓN

El macho alcanza la madurez sexual a los 70-84 días de vida; a los 40 días aproximadamente descienden los testículos e inicia la actividad sexual con una vida reproductiva larga de manera que la espermatogénesis persiste hasta los 22 meses de edad y probablemente continúe más tiempo (Marston y Chang, 1965).

La apertura vaginal se produce a los 40-60 días (Norris y Adams, 1979; Robinson, 1975), y alcanza la madurez sexual entre los 63 y 84 días (Marston y Chang, 1965), o a los 75 días según Norris (1972). Presenta variaciones individuales, ya que la preñez puede llevarse a cabo con éxito en una hembra de 47 días (Cheal, 1986). Las hembras en las que la apertura vaginal se produce antes de los 40 días tienen una mayor probabilidad de criar en el primer emparejamiento y presentan una vida reproductiva superior a la de las hembras con apertura vaginal tardía (Clark et al., 1986). Las hembras de madurez temprana se reproducen antes, tienen mayor número de camadas y un mayor número de crías por camada, pero en cambio presentan un comportamiento maternal reducido (Clark et al., 1986). No existe relación entre el peso corporal y la edad de apertura vaginal; la presencia de un macho antes de la apertura vaginal no la acelera (Norris y Adams, 1979).

La hembra es poliéstrica con tres periodos de receptividad sexual: post-parto, post-destete y en el propio ciclo estral cada 4-6 días. La receptividad de la hembra es de 12 a 15 horas y la ovulación se produce de manera espontánea (Norris, 1987). El intervalo entre partos es de 55 días, siendo un 9% de ellos entre los 25 y 29 días, el intervalo disminuye a 35 días si las crías son apartadas de la madre nada más nacer (Norris y Adams, 1979).

Puede inducirse una superovulación de la hembra con gonadotropina sérica humana (PMSG) o gonadotropina coriónica humana (HCG) e inseminar después con una dosis de espermatozoides en los cuernos uterinos (Wu, 1974).

La vida reproductiva media de las hembras es de 487 días, pudiendo tener 5-7 camadas de 4-6 crías. A medida que se acerca el final de su vida reproductiva el número de crías disminuye (Arrington et al., 1973) aunque según Norris y Adams (1979) existe un declive constante en la prolificidad a partir del segundo parto.

La gestación dura 24-26 días; si coincide con la lactación de la camada anterior la gestación se prolonga a unos 27 días porque tarda más en producirse la implantación del óvulo. Barfield y Beeman (1968) demostraron que cuanto mayor es la camada más larga es la gestación. Hasta el parto, el aumento de peso es de 10-30 g (Harkness y Wagner, 1995).

La media de crías por camada es de 7,1 según Arrington et al. (1973) y de 5,0 según Norris (1987). El promedio de crías por hembra y año es de 48,3 según Cheal (1986) y de 33,4 según Arrington et al. (1973). En una misma pareja al aumentar el número de camadas disminuye el número de crías (Fenn, 1983).

Normalmente los partos son nocturnos. Las crías pesan aproximadamente 2,5-3 g al nacer, los oídos se abren a los 5 días, el pelo aparece en 6 días, los incisivos erupcionan en 12-14 días y los ojos se abren a los 16-17 días. El destete de las crías se realiza a los 21-30 días, siendo el día 25 el más frecuente (Norris y Adams, 1979).

Aparece canibalismo en los casos en que hay un manejo deficiente de los animales (Marston, 1976), o de abandono si son camadas pequeñas (3 o menos crías), excesiva manipulación de las crías, falta de material para el nido, etc. (Harkness y Wagner, 1995). La adopción es posible si las crías huérfanas han nacido con pocos días de diferencia con respecto a las crías de la hembra que adopta (Harkness y Wagner, 1995).

El macho colabora en el cuidado de las crías por lo que no es necesario separarlo, sin embargo se puede separar durante las dos semanas siguientes al parto para evitar gestaciones en el celo posparto, aunque teniendo en cuenta la casi segura agresividad cuando se reintroduzca (Harkness y Wagner, 1995).

Los machos evitan contactar con sus crías el día del nacimiento, siendo interpretado como una inhibición del comportamiento paternal debido al celo postparto de la hembra (Clark et al., 1986). Piovanotti y Vieira (2004) describieron que en las

camadas que contaban con el macho la apertura de los ojos de las crías era más temprana.

Para sexar las crías hay que fijarse en que la distancia de la papila genital al ano es mayor en el macho que en la hembra (Norris, 1987).

La mortalidad neonatal por camada es aproximadamente del 20% (Norris y Adams, 1979).

1.12. UTILIZACIÓN EN EXPERIMENTACIÓN

El jerbo fue introducido como una nueva especie de laboratorio por Davidson en 1960 y su uso en el terreno de la experimentación ha aumentado desde que se estableció la primera colonia comercial en Estados Unidos (Robinson, 1975).

Ha sido utilizado en experimentos con radiaciones (Chang et al., 1964). Al presentar una mayor resistencia a las radiaciones que la mayoría de los roedores se han realizado investigaciones sobre la influencia de las radiaciones en la muerte celular y la aparición de aberraciones cromosómicas (Suzuki et al., 1992).

Por su particular vascularización encefálica se ha utilizado como biomodelo de isquemia cerebral (Paschen et al., 1987; Mayevsky y Breuer, 1992; Shinnou et al., 1998).

Su termorregulación y el efecto de las hormonas sobre ciertas glándulas lo hacen adecuado para estudios relacionados con la regulación hormonal y la respuesta orgánica (Loew, 1984).

Debido a su metabolismo de las grasas y la facilidad con que desarrollan lipemia ha sido aprovechado para realizar estudios relacionados con los lípidos en general y sus implicaciones en patologías metabólicas o cardiovasculares (Leach y Holub, 1984; DiFrancesco et al., 1990).

Ha sido utilizado para el estudio de infestaciones parasitarias experimentales (Okada et al., 1997; Jura et al., 1998; Nagahara et al., 1998), como biomodelo en estudios sobre giardiosis (Visvesvara et al., 1998), filariosis (Kinnamon et al., 1994),

equinocosis (Jura et al., 1998) y toxocariosis (Takayanagi et al., 1999) y en estudios relacionados con la eficacia de antihelmínticos (Conder et al., 1991).

En el campo de la audición, como modelo experimental de implantes cocleares (Hessel et al., 1997), e investigaciones acerca de la fisiología y patología auditiva (Ernst et al., 2000), ya que presentan una curva auditiva más cercana a la del hombre que la mayoría de los animales de laboratorio (Motzel y Wagner, 2000).

Ha sido útil en trabajos sobre metabolismo hídrico y las adaptaciones de su sistema renal a las condiciones de escasez de agua (Ichimura et al., 1993; Edwards y Peters, 1998). Existen trabajos sobre nefrotoxicidad como el de Port et al. (1974) en el campo de la intoxicación por plomo, el de Wolf et al. (1992) sobre la necrosis experimental de la papila renal y el de Sato et al. (1993) sobre glomerulonefritis inmunomediadas.

Debido a su alta susceptibilidad a padecer crisis convulsivas es un buen modelo en el estudio de la epilepsia (Loskota, 1974 y Loskota y Lomax, 1975). Más adelante Bertorelli et al. (1995) realizan también estudios sobre la epilepsia idiopática.

Ha sido utilizado para evaluar drogas que afectan a la fertilidad, para realizar estudios psicológicos debido a su comportamiento de marcaje territorial (Motzel y Wagner, 2000), y para el estudio de la catarata diabética (El-Aguizy et al., 1983).

1.13. VÍAS DE ADMINISTRACIÓN DE FÁRMACOS

La elección de una u otra dependerá de la naturaleza y el volumen de la sustancia empleada.

1.13.1. INTRAPERITONEAL

Se inmoviliza al animal y se coloca en decúbito supino ligeramente inclinado hacia craneal para desplazar las vísceras y no puncionarlas (Marston, 1976). Se utiliza una aguja 25G, inyectando en el cuadrante inferior derecho del animal.

1.13.2. ENDOVENOSA

Podemos utilizar la vena safena o la vena lateral de la cola (Laber-Laird, 1996). Field y Sibold (1999) recomiendan la vena lateral de la cola, así como West (1999). Sin embargo, Shinnou et al. (1998) emplean la vena femoral.

1.13.3. INTRAMUSCULAR

Se aplica en el muslo con cuidado de no dañar el nervio ciático (Field y Sibold, 1999).

1.13.4. SUBCUTÁNEA

El lugar más apropiado es entre los omoplatos del animal con relativa facilidad (Laber-Laird, 1996) o en la región más cercana al cuello (Norris, 1987).

1.13.5. ORAL

La sustancia a administrar se puede mezclar con el alimento o ser disuelta en el agua. Si la administración es forzada se utilizan sondas de acero inoxidable de 18-20G. Antes se ha de medir la distancia aproximada de la boca hasta el estómago con el fin de introducir la sonda hasta el lugar adecuado (Field y Sibold, 1999).

1.14. TOMA DE MUESTRAS

1.14.1. EXTRACCION DE SANGRE

El volumen total de sangre de un animal de 50 g es de 3,2-3,6 ml aproximadamente y la cantidad máxima de sangre a extraer no debe exceder el 10-15% de este volumen, por lo que las muestras a obtener no serán superiores a 0,5 ml (Harkness y Wagner, 1995). El volumen total de sangre para Moore (2000) es de 7,7 ml/100 g de peso corporal.

Contamos con varios métodos para la extracción de sangre en el jerbo según la cantidad a obtener: el plexo retroorbital, el corazón y la vena lateral de la cola (Marston, 1976).

Para extraer pequeñas cantidades de sangre, 0,1-0,3 ml, podemos utilizar el seno venoso retroorbital (Mays, 1969). Éste rellena la parte de la órbita no ocupada por el ojo, la periórbita y la glándula de Harder, presentando numerosas conexiones con las

demás zonas de la cabeza (Timm, 1989). El animal debe estar ligeramente anestesiado, el seno es más accesible en el canto lateral del ojo, aunque también puede accederse por el medial, introducimos un capilar heparinizado y con una pequeña presión se rompen los vasos del seno, con lo que la sangre sube por capilaridad y puede ser recogida (Laber-Laird, 1996).

Con la punción cardiaca obtenemos una mayor cantidad de sangre, alrededor del 50% del volumen total. Es necesaria la anestesia del animal, después abordamos lateral o ventralmente introduciendo una aguja de 22G a nivel ventricular y extraemos la cantidad de sangre necesaria. Esta técnica solo debe emplearse si su uso está plenamente justificado porque existe riesgo de provocar taponamiento cardiaco (Laber-Laird, 1996). La AALAS (American Association for Laboratory Animal Science) en su directorio del año 2000 recomienda que la punción cardiaca sea solamente aplicada en animales anestesiados y que sea un procedimiento terminal (previo a la eutanasia), siendo además la única técnica recomendada para la extracción de sangre en el jerbo.

Con un pequeño corte a nivel de la uña o de la cola podemos recoger pequeñas cantidades de sangre, pero estas técnicas presentan efectos secundarios adversos que podrían representar una alteración para el bienestar del animal (Field y Sibold, 1999).

También podemos extraer la muestra de la vena metatarsiana. Se depila la zona y se coloca un torniquete a nivel de la babilla, después introducimos una aguja de 25G y recogemos la muestra (Laber-Laird, 1996).

Morton et al. (1993) consideran métodos aceptables el corte de una uña, la amputación del rabo (ambas técnicas tienen efectos secundarios que podrían causar alteración en el bienestar del animal), la punción de la vena coccígea, la extracción del plexo retroorbital y la punción cardiaca bajo anestesia, dando como alternativa la vena yugular. Field y Sibold (1999) coinciden en considerar estas vías como las más aceptables.

Hem et al. (1998) han descrito como método la extracción de sangre de la vena safena y la extracción de la aorta abdominal (sangre arterial) y Norris (1987) de los vasos del cuello tras la decapitación.

1.14.2. RECOGIDA DE ORINA

Debido a la adaptación del jerbo a su hábitat natural la recogida de orina es problemática, ya que la cantidad de muestra a obtener es menor que en otros roedores de laboratorio (Marston, 1976).

Para ello necesitamos jaulas metabólicas homologadas o colocar papel de filtro como cama (Norris, 1987). McClure (1999) propone sustituir las jaulas de lecho continuo por otras con malla de acero inoxidable y colocar debajo una lámina de papel de aluminio para la recogida de la orina.

Mediante la estimulación manual del animal podemos obtener pequeñas cantidades de orina (Marston, 1976).

1.14.3. RECOGIDA DE HECES

Las heces son muy secas y duras en comparación con otros roedores, lo que facilita su recogida. Las jaulas metabólicas permiten la separación de las muestras de orina y heces (Norris, 1987).

1.15. ANESTESIA

Dependiendo del tipo de intervención y la duración de la misma utilizaremos unos agentes u otros:

La inhalación de éter es la menos indicada ya que provoca una rápida pero incontrolada inducción.

El pentobarbital sódico (0,01 ml/10 g peso) provoca una inducción lenta seguida de un prolongado tiempo de recuperación (Pagoaga et al., 1991).

La ketamina y la medetomidina consiguen planos medios de anestesia satisfactorios (Loew, 1984).

La ketamina inyectada junto con metoxifluorano inhalado ha sido utilizada con éxito por Smith y Kaplan (1974).

El halotano, isofluorano y metoxifluorano son buenos agentes para inducir y mantener la anestesia de forma segura (Cramlet y Jones, 1974).

1.16. EUTANASIA

1.16.1. DISLOCACIÓN Y DECAPITACIÓN CERVICAL

Método simple y humanitario.

1.16.2. ANESTÉSICOS INHALATORIOS

En habitáculo cerrado.

1.16.3. PENTOBARBITAL SÓDICO

El pentobarbital sódico puede utilizarse inyectado por vía intraperitoneal a dosis tres o cuatro veces superiores a la anestésica.

2. ERITROCITOS, HEMATÍES, GLÓBULOS ROJOS

2.1. INTRODUCCIÓN

La sangre es un fluido rojo, opaco, compuesto por el plasma, de color amarillo pálido (que se llama suero cuando se elimina el fibrinógeno) y diversos elementos celulares en suspensión como son los glóbulos rojos, hematíes o eritrocitos; los glóbulos blancos o leucocitos y las plaquetas o trombocitos (Giralt y Ercoreca, 1992).

El plasma está compuesto por agua, entre 6-8 g/dl de proteínas (mayoritariamente albúmina, globulinas y fibrinógeno) y 1,5 g/dl de compuestos inorgánicos, lípidos, carbohidratos, hormonas y vitaminas (Meyer y Harvey, 2004).

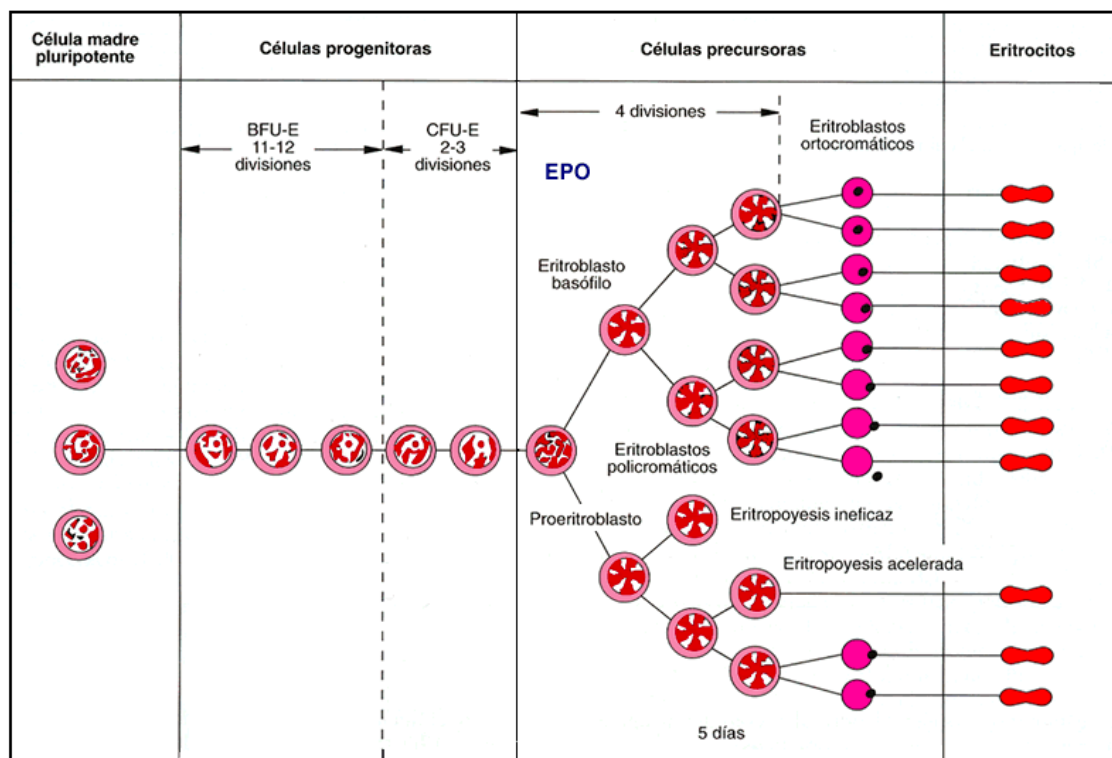
El eritrocito adulto es la célula más numerosa que encontramos en la sangre. No contiene orgánulos citoplasmáticos, núcleo, mitocondrias, ni ribosomas; únicamente podemos apreciar en él una membrana que rodea una solución de proteínas y electrolitos. Dentro de las proteínas, la hemoglobina supone el 95% y el resto son enzimas requeridas para la producción de energía y el mantenimiento de la hemoglobina en su estado funcional (Giralt y Ercoreca, 1992).

El hematíe es un disco bicóncavo en mamíferos, aunque en las extensiones de sangre periférica tiene una apariencia más o menos circular y según las especies con un área central más pálida resultado de la biconcavidad (Meyer y Harvey, 2004).

2.2. ERITROPOYESIS

Los órganos hematopoyéticos en los vertebrados incluyen la médula ósea, el bazo y el hígado. La médula ósea es el principal órgano durante el periodo postnatal, mientras que el bazo y el hígado, que son activos durante la fase fetal, sólo se reservan para situaciones de necesidad. En los roedores, el bazo presenta una significativa capacidad hematopoyética (Car, 2000).

La célula madre pluripotencial (CFU-LM) a través de factores microambientales y/o humorales da lugar al precursor más diferenciado de todas las líneas mieloides (CFU-GEMM) a partir del cual se forman los precursores de la línea eritroide BFU-E y CFU-E. La proliferación y diferenciación de las células están controladas por múltiples proteínas llamadas inductores. A partir de este último se forma el proeritroblasto, primera célula de la línea eritroide que se identifica morfológicamente (Harvey, 1997). El proeritroblasto produce teóricamente 16 eritrocitos adultos; en condiciones normales esto no es exacto ya que existe un cierto grado (1/8) de eritropoyesis ineficaz. Previamente se diferencia en los siguientes tipos celulares: eritroblasto basófilo, eritroblasto policromatófilo, eritroblasto ortocromático, reticulocito y finalmente el hematíe (Harvey, 1997).



(Tomado de URL: <http://www.igb.es/hematologia/atlas/eritropoyesis.htm>)

2.2.1. TIPOS CELULARES

Proeritroblasto:

Es una célula grande (20-25 μm), de citoplasma intensamente basófilo (gran cantidad de RNA), alta relación núcleo-citoplasma. El núcleo puede tener algún nucleolo y la cromatina es muy inmadura. Se divide por mitosis y se diferencia en eritroblasto basófilo.

Eritroblasto basófilo:

Semejante al anterior (16-18 μm), con núcleo menor y sin nucleolos. Se inicia la síntesis de hemoglobina pero el citoplasma sigue siendo basófilo. Sufrir dos mitosis consecutivas y se transforma en eritroblasto policromatófilo.

Eritroblasto policromatófilo:

De menor tamaño (8-12 μm) con citoplasma de color gris rosado (mayor contenido en hemoglobina) y núcleo pequeño. En este estadio se pierde la capacidad mitótica madurando hacia eritroblasto ortocromático.

Eritroblasto ortocromático:

Célula de tamaño 7-10 μm . Posee un núcleo picnótico y un citoplasma rosa-azulado debido a su alto contenido en hemoglobina. Madura perdiendo el núcleo por extrusión y se transforma en reticulocito.

Reticulocito:

Es el paso previo a eritrocito adulto. Madura en sangre periférica perdiendo membrana, receptores, ribosomas y otros orgánulos reduciendo su tamaño y pasando su forma a ser un disco bicóncavo (Jain, 1993).

2.2.2. REGULACIÓN DE LA ERITROPOYESIS

Eritropoyetina: Es una glicoproteína de origen renal con peso molecular de 29.000 daltons. Actúa sobre la médula ósea estimulando la eritropoyesis. Es sintetizada en las células intersticiales peritubulares (Car, 2000).

Otros factores: La testosterona y los esteroides estimulan la eritropoyesis incrementando la formación de eritropoyetina al igual que las hormonas tiroideas, la hormona del crecimiento, la somatotropina coriónica, el factor de crecimiento plaquetario y la insulina (Jain, 1993).

2.3. FUNCIONES

Las funciones principales del hematíe son el transporte de oxígeno a los tejidos, la retirada de dióxido de carbono y la amortiguación de las variaciones de pH sanguíneo (Harvey, 1997).

2.3.1. HEMOGLOBINA

La hemoglobina es una proteína tetramérica constituida por la unión de dos dímeros de cadenas homólogas (α y β) y con un peso molecular aproximado de 65.000 daltons (Harvey, 1997).

El 96% de la molécula está compuesta por una proteína o globina, y el resto por un grupo prostético o hemo, constituido por hierro y protoporfirina. El grupo hemo es un tetrapirrol formado por un átomo de hierro coordinado con 4 anillos pirrólicos a través de sus respectivos átomos de nitrógeno. Los anillos pirrólicos se unen unos con otros

a través de puentes meteno (=CH-) formando una estructura en anillo. El átomo de hierro está unido a cada uno de los anillos pirrólicos dejando dos sitios de unión; uno se une a una histidina de la cadena de la globina; el otro es específico para la unión del oxígeno para formar oxihemoglobina. El átomo de hierro se encuentra en estado reducido ya que cuando se oxida se pierde la capacidad de fijar oxígeno (metahemoglobina) (Kaneko, 2000).

El tetrámero de hemoglobina se encuentra en equilibrio entre dos configuraciones espaciales estables entre sí: la configuración oxigenada (oxihemoglobina) y la desoxigenada (desoxihemoglobina). En la primera, la afinidad por el oxígeno es alta mientras que en la segunda es pequeña. Fisiológicamente estos cambios son importantes ya que facilita la liberación de oxígeno en los tejidos mientras que se incrementa su captación en los pulmones. Este efecto es debido a cambios en el pH (efecto Bohr), CO₂ y 2,3 DPG (Kaneko, 2000).

El paso de oxi a desoxi de la hemoglobina se inicia por un cambio en la posición del Fe del anillo de porfirina. En la forma desoxi el átomo de Fe está ligeramente en el exterior del plano de la porfirina; cuando se une el oxígeno, el átomo se desplaza hacia el interior. Estos cambios producen distintas configuraciones en la molécula de hemoglobina afectando a su afinidad por el oxígeno y produciendo la característica curva sigmoidea de disociación (Kaneko, 2000). La relación entre la tensión de O₂ de la sangre y la saturación de O₂ por la hemoglobina constituye la curva sigmoidea de disociación que depende también del pH (efecto Bohr), de la temperatura y del 2,3 DPG. Una ligera disminución de la tensión de oxígeno conlleva una disminución en la saturación de la hemoglobina liberándose una cantidad sustancial de oxígeno de la sangre a los tejidos y viceversa (Meyer y Harvey, 2004).

2.3.2. EFECTO BOHR

La afinidad del oxígeno por la hemoglobina disminuye a medida que lo hace el pH (acidosis). Dado que en los tejidos existe una mayor concentración de CO₂, el pH venoso es menor que el pH arterial, por lo que por el efecto Bohr se facilita la transferencia de oxígeno de la hemoglobina a los tejidos. Por otro lado en los pulmones la expulsión de CO₂ aumenta el pH, y por lo tanto crece la afinidad del O₂ por la hemoglobina y por consiguiente su captación (Ercoreca y Giralt, 1992).

2.3.3. 2,3 DIFOSFOGLICERATO

Los hematíes presentan una concentración importante de 2,3 DPG, un producto intermedio del metabolismo glucolítico. En la forma desoxihemoglobina puede unirse el 2,3 DPG en relación 1:1, reduciéndose la afinidad de ésta por el oxígeno ya que se fija en la cavidad central de la molécula formando nuevos enlaces salinos y estabilizando la forma desoxi, lo que facilitará la liberación de oxígeno a los tejidos. Los niveles de 2,3 DPG aumentan en situaciones de hipoxia (Ercoreca y Giralt, 1992).

2.3.4. TRANSPORTE DE CO₂

El transporte desde los tejidos a los pulmones no ocurre por unión directa al grupo hemo. El CO₂ difunde al interior de la célula donde se produce de manera espontánea pero es acelerado por la anhidrasa carbónica y mediante la reacción $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ se forma H₂CO₃ (ácido carbónico) el cual se transforma en CO₃H⁻ (bicarbonato) e ión H⁺, el cual es aceptado por la hemoglobina en un proceso facilitado por el efecto Bohr, mientras que el CO₃H⁻ difunde al exterior celular. El 60% del CO₂ es transportado de esta forma, el 10% en solución sanguínea y el 30% restante unido a los aminoácidos de la desoxihemoglobina, formando la carbaminohemoglobina (Harvey, 1997).

2.3.5. EFECTO AMORTIGUADOR DEL pH SANGUÍNEO

La hemoglobina, al igual que la mayor parte de las proteínas, es un excelente amortiguador ácido-básico pero dada su alta concentración en el organismo y el alto número de histidinas (38 por tetrámero) presenta 6 veces más capacidad de amortiguación que las proteínas plasmáticas (Harvey, 1997).

2.4. METABOLISMO DEL ERITROCITO

Básicamente los requerimientos energéticos se destinan a mantener:

- El hierro en forma divalente para que la hemoglobina pueda fijar reversiblemente el oxígeno.
- La concentración intraeritrocitaria de sodio y potasio contra gradiente.
- Los sistemas enzimáticos activos.
- La molécula de hemoglobina en forma activa.
- La forma bicóncava del hematíe.

Estas funciones las realiza el eritrocito gracias a su dotación enzimática proveniente del período eritroblástico de la eritropoyesis. No dispone de ribosomas ni mitocondrias, por lo que su única fuente de energía proviene del metabolismo de la glucosa (Ercoreca y Giralt, 1992).

2.4.1. VÍA DE LA GLUCÓLISIS ANAEROBIA O VÍA DE EMBDEN-MEYERHOFF

A través de esta vía se metaboliza 90-95% de la glucosa. Dentro del hematíe se realiza en dos etapas:

- Transformación de una molécula de glucosa en dos de triosa-fosfato (gliceraldehido 3 fosfato y dihidroxiacetona) con consumo de dos moléculas de ATP.
- Transformación de las dos moléculas triosa-fosfato en piruvato, con producción de cuatro moléculas de ATP y dos de NADH (Jain, 1993).

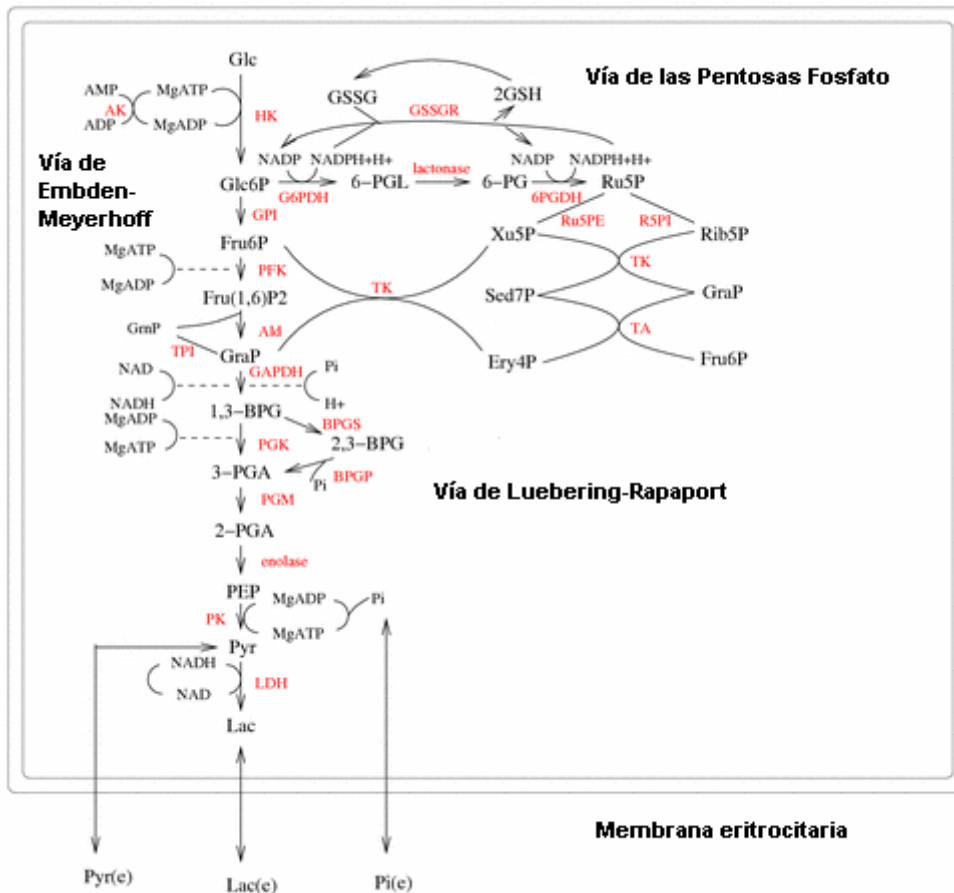
2.4.2. VÍA DE LA GLUCÓLISIS AEROBIA, DE LAS HEXOSAS-MONOFOSFATO O DE LAS PENTOSAS FOSFATO

Esta vía constituye el 5-10% del metabolismo de la glucosa y requiere de la presencia de oxígeno.

Es la mayor fuente de NADPH, produciéndose 2 moles de NADPH por mol de glucosa metabolizada. Dicha producción es muy importante ya que el NADPH actúa como donante de electrones en la reducción del glutatión (Meyer y Harvey, 2004).

2.4.3. VÍA DE LUEBERING-RAPAPORT O DE 2,3 DPG

Tiene el fin de formar y acumular 2,3 DPG para que interaccione con la hemoglobina, regulando la afinidad de ésta por el oxígeno facilitando su liberación a los tejidos (Jain, 1993).



(Modificado de Lloyd, 1999)

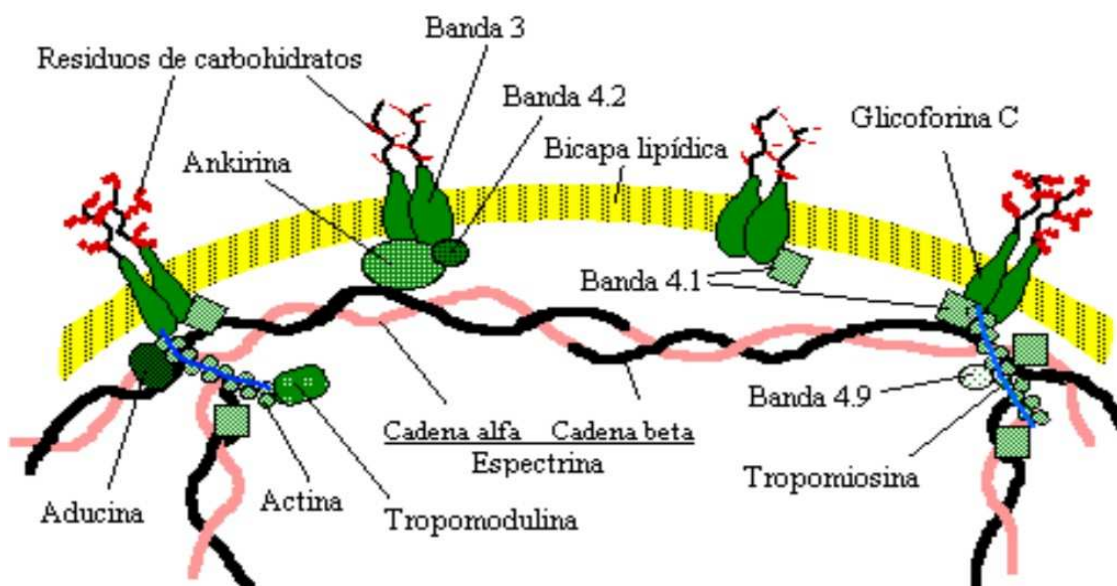
2.5. MEMBRANA ERITROCITARIA

La membrana eritrocitaria es una estructura formada por una bicapa lipídica unida a un intrincado esqueleto de proteínas, el cual mantiene la forma bicóncava de la célula y le brinda extraordinaria elasticidad. Por otra parte, la red de proteínas cumple funciones metabólicas debido a la presencia de canales y bombas iónicas encargadas de mantener el gradiente osmótico.

2.5.1. ESTRUCTURA Y ORGANIZACIÓN

- **Proteínas:** Constituyen el 50% del peso seco de la membrana. Principalmente son glicoproteínas y sialoglicoproteínas. Las proteínas periféricas interactúan entre sí para formar una malla o enrejado que recubre la cara interior de la doble capa de fosfolípidos y son las responsables de la estabilidad y las propiedades viscoelásticas de la membrana. Tras la extracción de los componentes lipídicos y por electroforesis

en gel de poliacrilamida, se ha comprobado la existencia de diferentes bandas proteicas. Entre ellas destacan la espectrina, la ankirina, la banda 4.1, la banda 4.2, la banda 4.9, la aducina, la tropomiosina y la banda 7 (Herrera García y Estrada Cueto, 2002). La espectrina, actina y las bandas 4.1 y 4.9 forman la estructura básica del citoesqueleto. El componente de mayor masa molecular en el citoesqueleto de la membrana del eritrocito es la espectrina. Tetrámeros de espectrinas están unidos con la membrana por la proteína ankirina, la cual está conectada a la banda 3. El objetivo de la banda 4.2 es estabilizar la unión entre la ankirina y el intercambiador aniónico banda 3. La espectrina se une también con la glicoforina C mediante la banda 4.1; este entramado es anclado en múltiples sitios de la membrana. La banda 4.1, así como la aducina, estabilizan la asociación de la espectrina con la actina. Subunidades de actina forman microfilamentos con la tropomiosina, a los que se asocia la proteína tropomodulina. La banda 4.9, conocida también como dematina, produce el entrecruzamiento de estos microfilamentos de actina (Arce Hernández y Villanueva, 2005).



(Tomado de Arce Hernández y Villanueva, 2005)

- **Lípidos:** Constituyen el 40% de la membrana. Principalmente son fosfolípidos, colesterol y pequeñas proporciones de glicolípidos y ácidos grasos libres. Los fosfolípidos se disponen de forma asimétrica entre las líneas externa e interna de la capa lipídica; de esta forma la fosfatidilcolina se localiza principalmente en el exterior

mientras que la fosfatidiletanolamina y la fosfaetilserina en el interior. Esta distribución asimétrica está determinada por la asociación específica de ciertas clases de fosfolípidos en regiones determinadas de la membrana mediante la interacción entre subclases de fosfolípidos con las proteínas de membrana. El colesterol se intercambia libremente entre las líneas externa e interna de la membrana, encontrándose en equilibrio con el colesterol plasmático (Jain, 1993).

- **Carbohidratos:** Constituyen el 8%. Están localizados en la superficie externa formando cadenas de oligosacáridos unidos a glicoproteínas y a glicolípidos. Las diferencias en los residuos terminales de carbohidratos presentes en las proteínas de superficie determinan los distintos grupos sanguíneos (Jain, 1993).

2.5.2. EQUILIBRIO OSMÓTICO

En el eritrocito existe una alta cantidad de potasio, bajo contenido de sodio y calcio, con una cantidad variable de cloro. Para mantener estas condiciones son necesarios una serie de mecanismos, como sistemas de transporte activo dependientes de ATP (destacando la bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ y la bomba de calcio) y sistemas de transporte pasivo (cotransporte de $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$, cotransporte de $\text{K}^+\text{-Cl}^-$, sistemas de intercambio $\text{Na}^+\text{-H}^+$ y canales transmembrana) (Serrano et al., 2001).

2.6. ERITROCATERESIS

A medida que el eritrocito envejece disminuye su actividad glucolítica y por tanto la disponibilidad de ATP, lo que origina la disfunción de la bomba sodio-potasio y una menor deformabilidad celular. Asimismo disminuye la actividad de la vía de las pentosas-fosfato reduciendo su resistencia al daño oxidativo lo que provoca cambios irreversibles en la estructura y función de la hemoglobina. Waught et al. (1992) demostraron que los eritrocitos envejecidos presentaban una menor elasticidad debido a la disminución del área de su membrana y a la deshidratación celular.

Se ha descrito que los eritrocitos viejos son más densos que los jóvenes, que tienen disminuidos los niveles de fosfatos orgánicos (ATP), un pH intracelular más alcalino, menor cantidad de 2,3 DPG y una mayor cantidad de hemoglobina que el de los jóvenes. Estos hallazgos proveen evidencias experimentales indirectas que apoyan un incremento aparente en la afinidad de la hemoglobina hacia el oxígeno y una

liberación de oxígeno deficiente en los eritrocitos envejecidos in vivo (Romero y Romero, 2004):

Parámetro	Jóvenes	Viejos
pHi (pHo = 7.4; 37°C)	7,09 ± 0,0	7,23 ± 0,0
2,3 DPG (μmoles/g Hb)	15,0 ± 1,6	10,7 ± 1,9
ATP (μmoles/g Hb)	2,2 ± 0,20	1,3 ± 0,29
Hb (g/ml de eritrocitos)	0,42 ± 0,0	0,49 ± 0,0
P ₅₀ (mm Hg)	26,5 ± 1,1	22,4 ± 1,3

Todo ello conduce a la destrucción fisiológica del hematíe que se realiza principalmente por los siguientes mecanismos: fragmentación, lisis osmótica, eritrofagocitosis y citólisis inducida por el complemento (García-Conde y Solano, 2004):

2.6.1. HEMÓLISIS EXTRAVASCULAR

Fisiológicamente el 80-90% de la destrucción eritrocitaria se produce en el espacio extravascular a través de los macrófagos del SRE (sistema retículo-endotelial). Si la alteración eritrocitaria es importante la destrucción se realiza en todos los lugares del SRE (especialmente en hígado por su gran flujo sanguíneo), mientras que si la alteración no es tan importante se realiza en el bazo debido a la circulación lenta y sinuosa de este órgano junto con un ambiente particular caracterizado por una reducida concentración de glucosa, hipoxia ligera, hipercapnia y pH relativamente bajo, nocivo para los eritrocitos más senescentes (Giger, 2002). La hemoglobina se escinde en el grupo hemo y la globina. El anillo hemo, una vez fuera el átomo de Fe es degradado por la hemo oxigenasa a CO y biliverdina (compuesto tetrapirrólico de cadena abierta), que rápidamente es reducido por la biliverdina reductasa a bilirrubina (no conjugada o indirecta). El CO se transporta como carboxihemoglobina a los pulmones, el Fe es transportado por la transferrina a la médula ósea o almacenado en las células del SRE (en forma de ferritina o hemosiderina) y el péptido globina se hidroliza y los aminoácidos son reutilizados. La bilirrubina es excretada al torrente sanguíneo uniéndose a la albúmina debido a su insolubilidad y transportada al hígado. Es captada por las células hepáticas y conjugada con el ácido glucurónico mediante la enzima glucuronil transferasa resultando bilirrubina directa o conjugada, soluble en agua, por lo que puede excretarse por la bilis hacia el duodeno, aunque en presencia

de una desintegración masiva del grupo hemo se vuelve a verter al plasma y también es excretada por la orina. Las bacterias intestinales del colon convierten la bilirrubina en urobilinógeno siendo la mayor parte de éste eliminado en las heces aunque una cantidad mínima es reabsorbida. El urobilinógeno reabsorbido es reexcretado por el hígado (circulación enterohepática) con una porción eliminada por la orina (Giger, 2002).

2.6.2. HEMÓLISIS INTRAVASCULAR

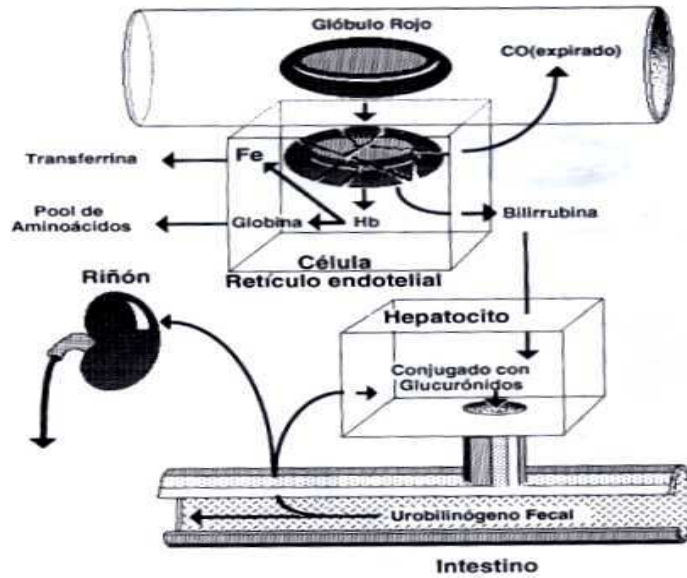
El 10-20% restante de la destrucción se produce en el torrente vascular. En esta situación la hemoglobina se libera dentro de la circulación debiendo ser retirada para evitar la pérdida de hemoglobina y del hierro y preservar la función tubular renal mediante los siguientes mecanismos (Stockham y Scott, 2002):

Haptoglobina: La hemoglobina inestable liberada en el plasma se rompe en dímeros y es captada por la haptoglobina (α_2 glicoproteína) de síntesis hepática. Dicha unión es irreversible y el complejo es catabolizado por las células del parénquima hepático (Kino et al., 1987).

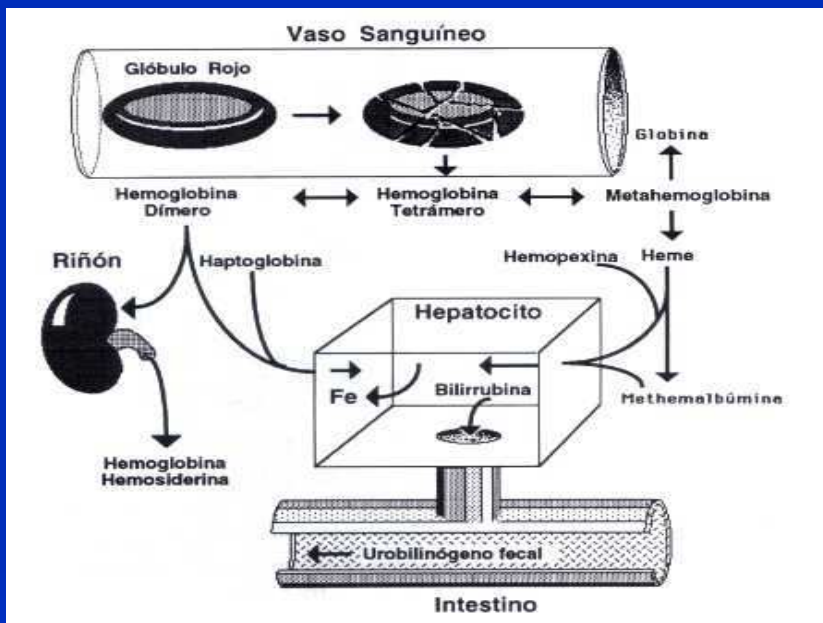
Hemo plasmático: La hemoglobina libre en plasma puede oxidarse a metahemoglobina, la cual se disocia fácilmente en hemo y globina. Los aminoácidos de la globina serán reutilizados en la síntesis proteica. El grupo hemo en el plasma es muy insoluble por lo que se une a la hemopexina (β_1 globulina) de síntesis hepática. El complejo formado es metabolizado por el hígado. El grupo hemo también puede unirse a la albúmina, formándose metalbúmina, transfiriéndose de forma gradual el grupo hemo a la hemopexina siendo metabolizada por los hepatocitos (Stockham y Scott, 2002).

Aclaramiento renal: Cuando los sistemas de conservación se saturan aparecen dímeros de hemoglobina libre en el plasma (hemoglobinemia) siendo metabolizados por el hígado. Los dímeros α y β pueden atravesar el glomérulo y ser reabsorbidos por las células del túbulo proximal, las cuales tienen cierta capacidad para metabolizar la hemoglobina a bilirrubina conjugada y almacenar hierro. Si la hemólisis es intensa puede aparecer hemoglobinuria y hemosideruria (Kino et al., 1987).

Hemólisis Extravascular



Hemólisis Intravascular



Tomado

de

<http://escuela.med.puc.cl/paginas/cursos/servicio/meb203b/ProgramaQF/Anemia.ppt>

3. ANEMIAS

3.1. SIGNOS CLINICOS DE LA ANEMIA

Están relacionados con la disminución de la capacidad de la sangre para transportar oxígeno de la sangre y los intentos del organismo por compensarla. Los signos variarán dependiendo de la velocidad con que se desarrolle, la intensidad y la causa de la anemia. Los signos habituales son palidez de las mucosas, intolerancia al ejercicio, taquicardia, taquipnea y disnea de esfuerzo (Voigt, 2003). Además, en la anemia hemolítica, la palidez de las mucosas puede ser enmascarada por la ictericia y aparecer hemoglobinemia, hemoglobinuria y nefrosis debido a ésta (Jain, 1993).

3.2. ÍNDICES ERITROCITARIOS

3.2.1. VOLUMEN CORPUSCULAR MEDIO

Representa el volumen medio del eritrocito. Las unidades en las que se expresa son femtolitros o μ^3 .

Según sea el tamaño de los glóbulos rojos, normal, más grande o más pequeño, la anemia se puede clasificar como:

Normocítica

Macroscítica

Microscítica

La macrocitosis está normalmente asociada a anemias regenerativas ya que el volumen de los reticulocitos es mayor que el del hematíe maduro (Meyer y Harvey, 2004).

La microcitosis se asocia habitualmente con deficiencias de hierro ya que éste es imprescindible para la síntesis de la hemoglobina (Meyer y Harvey, 2004).

3.2.2. CONCENTRACIÓN DE HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MEDIA

Determina la concentración de hemoglobina en el eritrocito medio. La concentración resultante se expresa en g/dl.

Según este parámetro la anemia se puede clasificar como:

Normocrómica

Hipocrómica

Hiperocrómica

El término hiperocrómica se aplicaría para valores por encima de lo normal, pero como los eritrocitos normales se encuentran completamente saturados de hemoglobina, no se ha descrito esta situación. Un valor alto de CHCM es un artefacto resultado de hemólisis, lipemia o presencia de cuerpos de Heinz. En el caso de la hemólisis aparece hemoglobina libre en el plasma y la fórmula que utilizamos para calcular la CHCM asume que toda la hemoglobina medida por el contador hematológico está contenida en los eritrocitos. La lipemia y la presencia de cuerpos de Heinz provocan turbidez, cuando se mide la hemoglobina por espectrofotometría, resultando valores erróneamente aumentados (Meyer y Harvey, 2004).

La anemia hipocrómica aparece más frecuentemente en anemias muy regenerativas con un alto número de reticulocitos y en carencias crónicas de hierro (Meyer y Harvey, 2004).

3.2.3. HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MEDIA

Expresa la cantidad de hemoglobina por unidad de peso del eritrocito. El peso de la hemoglobina resultante se expresa en picogramos (10^{-12} g).

Según este parámetro la anemia se puede clasificar como:

Normocrómica

Hiperocrómica

Hipocrómica

Se utiliza con una menor frecuencia debido a la enorme variación entre especies del tamaño y el contenido de hemoglobina de los glóbulos rojos (Voigt, 2003).

3.3. CLASIFICACIÓN DE LAS ANEMIAS

El carácter fisiopatológico de las anemias viene definido por la capacidad regenerativa de la médula ósea. El criterio más práctico para definir esta situación consiste en la determinación absoluta o corregida de reticulocitos. Las anemias regenerativas presentan reticulocitosis, que es responsable de una cierta macrocitosis y policromasia (García-Conde y Solano, 2004).

La policromasia es la presencia de eritrocitos sin núcleo, de mayor tamaño y con una tonalidad azulada, cuando se observa la extensión sanguínea teñida con una tinción del tipo Diff Quick®. Estas células son azuladas debido a la presencia de ARN ribosómico necesario para la síntesis de hemoglobina y se corresponden con reticulocitos, al ser teñidos con una tinción supravital como el Nuevo azul de metileno (Voigt, 2003).

CÁLCULO DE LA REGENERACIÓN MEDULAR (Ford y Rebar, 1992)

Porcentaje reticulocítico (PR) = Cantidad de reticulocitos en 1000 eritrocitos de la extensión sanguínea. Se expresa en %.

Sin embargo este porcentaje es difícil de interpretar, ya que con un hematocrito muy bajo aumentaría proporcionalmente el recuento reticulocitario puesto que si se pierden o destruyen eritrocitos en el organismo por cualquier motivo la mayoría serán eritrocitos maduros.

Recuento reticulocítico corregido (PRC) = Se obtiene según la fórmula: $PR \times \frac{\text{hematocrito del paciente}}{\text{hematocrito normal de la especie}}$. Se expresa en %.

3.3.1. CLASIFICACIÓN FISIOPATOLÓGICA

REGENERATIVAS:

Pérdida de sangre o hemorragia

Hemolíticas

- Parásitos, bacterias, virus, rickettsias
- Fármacos y productos químicos
- Desórdenes metabólicos
- Defectos eritrocitarios

- Desórdenes inmunomediados

HIPOREGENERATIVAS O ARREGENERATIVAS:

- Deficiencias nutricionales
- Enfermedades inflamatorias
- Desórdenes mieloproliferativos

3.3.2. CLASIFICACIÓN MORFOLÓGICA

La clasificación morfológica agrupa aquellas anemias que son similares en tamaño celular y en contenido de hemoglobina según cambios observados y medidos en los eritrocitos. Se realiza basándose en los valores obtenidos de los índices eritrocitarios VCM y CHCM (Voigt, 2003).

3.4. ANEMIA HEMOLÍTICA POR OXIDACIÓN

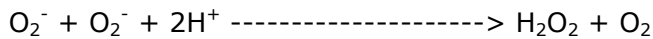
3.4.1. PROTECCIÓN ANTIOXIDANTE DEL ERITROCITO

Se consideran radicales libres aquellas moléculas que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración espacial que genera una alta inestabilidad. Es una entidad química que es desapareada, al contrario de los electrones localizados en los átomos y moléculas que tienden de manera espontánea a la formación de parejas. Esto lo hace muy inestable, extraordinariamente reactivo y de vida efímera, con una enorme capacidad para combinarse inespecíficamente en la mayoría de los casos, así como con la diversidad de moléculas integrantes de la estructura celular: carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y derivados de cada uno de ellos (Rodríguez Perón et al., 2001).

Por su potencial efecto destructivo el organismo utiliza potentes mecanismos para evitar la acumulación de estos radicales libres; entre éstos se encuentran medios antioxidantes endógenos constituidos por algunos sistemas enzimáticos y otros exógenos constituidos por algunas vitaminas.

Superóxido Dismutasa: Enzima que cataliza la reacción del radical superóxido (O_2^-) en H_2O_2 y O_2 (Harvey, 1997).

SOD



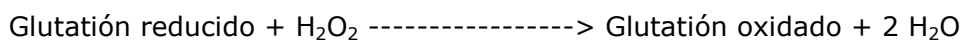
Glutación: El glutación es un tripéptido que contiene un grupo sulfhidrilo. Los hematíes contienen una concentración relativamente importante de glutación reducido (GSH) que actúa como tampón impidiendo la acción de los agentes oxidantes intra y extraeritrocitarios. Cuando se producen oxidantes tales como el oxígeno, el peróxido de hidrógeno H_2O_2 , el glutación reducido (GSH) funciona como desoxidante. GSH es sustrato de la enzima glutación peroxidasa, la cual proporciona electrones para la reducción de los oxidantes oxidando el GSH a GSSG. El GSH también puede reaccionar directamente con radicales libres (Harvey, 1997).

Glutación Reductasa: Flavoenzima dependiente del nicotinamín adenín dinucleótido fosfato reducido (NADPH) que cataliza la reducción del glutación oxidado (GSSG) a glutación reducido (GSH) utilizando el NADPH como donante de electrones (Meyer y Harvey, 2004).

Glutación S-Transferasa: Cataliza la formación de glutación-S-conjugados (GSSG) entre GSH y ciertos sustratos electrofílicos protegiendo contra agentes oxidantes (Harvey, 1997).

Glutación Peroxidasa: Utiliza el glutación reducido (GSH) para la reducción del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a H_2O y los lipoperóxidos (L-OOH) protegiendo de la peroxidación lipídica (Rodríguez Perón et al., 2001).

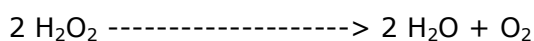
GPx



Tioltransferasa: Usando GSH puede restaurar los grupos tiol en proteínas dañadas por oxidantes (Harvey, 1997).

Catalasa: Cataliza la reacción a H_2O_2 y oxígeno molecular (Rodríguez Perón et al., 2001).

CAT



Vitamina E: El radical hidroxilo (OH⁻) puede ser neutralizado por la vitamina E o alfa-tocoferol, que es un antioxidante efectivo y que por su hidrofobicidad se encuentra en las membranas biológicas evitando la peroxidación lipídica (Rodríguez Perón et al., 2001).

Vitamina C: La vitamina C o ácido ascórbico es un agente reductor o donador de electrones y reacciona rápidamente con el radical OH⁻ (Rodríguez Perón et al., 2001).

Reducción de la metahemoglobina: Aproximadamente el 3% de la hemoglobina (Fe⁺²) es oxidada a metahemoglobina (Fe⁺³) cada día. La metahemoglobina es incapaz de ligar el oxígeno siendo ésta de nuevo reducida por la enzima NADH metahemoglobina reductasa (citocromo b5 reductasa) y la NADPH metahemoglobina reductasa (Harvey, 1997).

3.4.2. ANEMIA HEMOLÍTICA INDUCIDA POR AGENTES QUÍMICOS

Muchos compuestos, incluyendo agentes químicos, medicamentos, metales o componentes alimenticios pueden inducir daño oxidativo a los eritrocitos con la resultante anemia hemolítica. En algunos casos, el propio producto químico actúa como agente oxidante, pero a menudo el compuesto o sus metabolitos interactúan con el oxígeno formando radicales libres y peróxidos. De este modo se puede lesionar el eritrocito por uno o varios de los siguientes mecanismos (Giger, 2002).

Metahemoglobinemia

La metahemoglobina es la forma de hemoglobina en la cual el hierro del grupo hemo se ha oxidado del estado ferroso (Fe⁺²) al férrico (Fe⁺³) y por tanto es incapaz de unir el oxígeno. En condiciones normales cerca del 3% de la hemoglobina es oxidada diariamente de manera espontánea por la generación de oxidantes en las rutas metabólicas. Es un proceso reversible ya que la metahemoglobina se reduce de forma continua. El contenido en metahemoglobina puede ser cuantificado mediante espectrofotometría, clínicamente un contenido superior al 10% da a la sangre un color marrón característico (Harvey, 1997).

Cuerpos de Heinz

Los cuerpos de Heinz están formados por hemoglobina oxidada, desnaturalizada y precipitada de manera irreversible en los eritrocitos. Los cambios conformacionales de

las cadenas de globina causados por la oxidación de los grupos sulfhidrilo de la hemoglobina y daño oxidativo de la membrana permiten la fijación y agregación de la hemoglobina precipitada junto a la membrana. Los eritrocitos con cuerpos de Heinz presentan una deformabilidad reducida por lo que son retenidos en el bazo, siendo fagocitados o eliminando de manera selectiva los cuerpos de Heinz junto con la porción de membrana dañada por la oxidación (Giger, 2002).

Lesión en la membrana

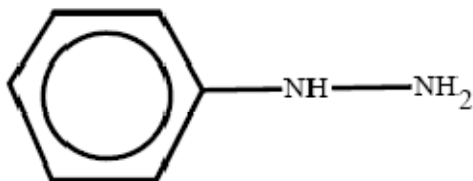
Muchos agentes oxidantes ocasionan directamente la peroxidación lipídica de la membrana, entrecruzamiento y agrupación de proteínas del citoesqueleto y deterioro del transporte iónico. La peroxidación lipídica es el daño oxidativo producido particularmente por el radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$) sobre los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares. Inicialmente, un ácido graso se oxida por salida de un átomo de hidrógeno de un grupo metileno hacia el $\text{OH}\cdot$, que actúa como agente oxidante, produciéndose radical peroxilo. Éste, a su vez, repite el proceso en cadena hasta la muerte celular (Andresen, 2006).

Estas lesiones provocan un incremento de la rigidez de la membrana, un deterioro del transporte iónico y la formación de antígenos en la superficie de la membrana. Esto último provoca la unión de anticuerpos y la fijación del complemento conduciendo a una hemólisis intravascular, si el daño oxidativo es muy intenso y se activa la cascada del complemento, o extravascular (ya sea eritrofagocitosis total o sólo parcial de la zona dañada) en el resto de los casos (Jain, 1993).

En el caso de la hemólisis extravascular, como consecuencia de la lesión de la membrana, los eritrocitos dañados son reconocidos y eliminados por los macrófagos del bazo, hígado y médula ósea, siendo el primero el órgano más eficiente (Baerlocher et al., 1994).

FENILHIDRACINA

La fenilhidracina hidrociorada ($\text{C}_6\text{H}_5\text{-NH-NH}_2\text{.CLH}$) fue el oxidante utilizado en la realización del protocolo experimental. Como sinónimo podemos utilizar hidrazinobenceno.



Fenilhidracina (PHZ) fue la primera hidracina derivada descubierta por Emil Hermann Fischer en 1875. Tiene un peso molecular de 108 daltons. Se encuentra como cristales de color marrón o como un líquido aceitoso de color amarillento, con un punto de congelación de 19,6 °C y un punto de ebullición de 243,4 °C. (McIsaac et al., 1958; Cumming et al., 1967).

Debido a su fuerte capacidad reductora se utiliza como intermediario en la síntesis química, fotografía, metalurgia, plaguicidas y agentes textiles. También se ha utilizado en la síntesis de productos farmacéuticos y el tratamiento de la policitemia vera (Cary et al., 2000).

Derivados de la PHZ se utilizaron en primer lugar como antipiréticos pero la acción tóxica en los glóbulos rojos hizo su uso peligroso. El clorhidrato de fenilhidracina se administró por vía oral (por lo general en torno a 100-200 mg/día) para el tratamiento de la policitemia vera (Falconer 1933). En algunos casos, el tratamiento fue eficaz; en otros, sin embargo, el resultado fue fatal (Giffin y Allen, 1928; Giffin y Conner 1929).

La PHZ disminuye el nivel de hemoglobina, el número de eritrocitos y el volumen celular, y afecta negativamente a la deformabilidad eritrocitaria. Induce reticulocitosis, hemoglobinemia, formación de cuerpos de Heinz, aumento de los niveles de eritropoyetina y hematopoyesis extramedular en el bazo e hígado (Hara y Ogawa, 1975; Berger, 1985; Stern, 1989).

La intensidad de la anemia inducida depende de la edad (Berger, 1987; Naeshiro et al., 1998). El mayor descenso del número de eritrocitos, hemoglobina y hematocrito se encontró en ratas de mayor edad, mientras que los mayores aumentos de volumen corpuscular medio (VCM) se encontraron en los animales adultos jóvenes. Esto podría ser debido a la menor resistencia de glóbulos rojos en los animales más viejos (Berger 1987).

Heinz (1890) descubrió agregados dentro de los glóbulos rojos que se formaron en eritrocitos expuestos a la PHZ recibiendo posteriormente esos agregados el nombre de cuerpos de Heinz.

Mecanismo a nivel celular

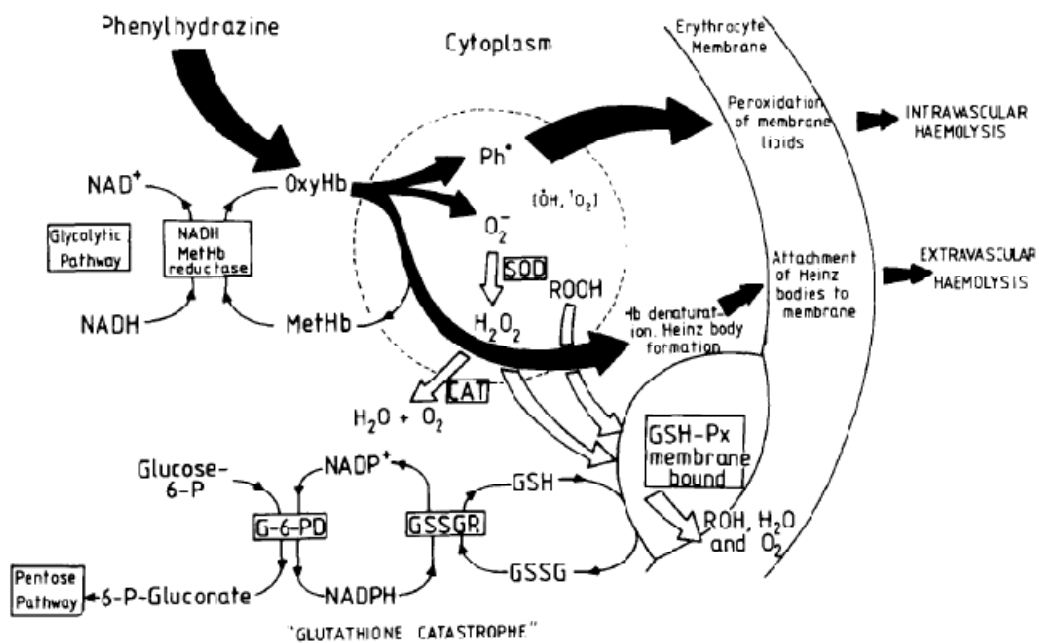


Fig. 6. A mechanism for phenylhydrazine-induced haemolysis: attack and defence mechanisms. G-6-PD, glucose-6-phosphate dehydrogenase; GSSGR, glutathione peroxidase; Hb, haemoglobin; SOD, superoxide dismutase; CAT, catalase; GSH-Px, glutathione peroxidase; Ph·, phenyl radical.

(Tomado de Hill y Thornalley, 1983)

La PHZ aumenta las especies reactivas del oxígeno (ROS), provoca la peroxidación lipídica, y la disminución de glutatión reducido (GSH). Estos efectos pueden ser contrarrestados por la administración de N-acetilcisteína, un conocido neutralizante de las especies reactivas del oxígeno (ROS) (Hill y Thornalley, 1982; Amer et al., 2004).

La anemia hemolítica extravascular es causada por la absorción de eritrocitos por macrófagos en el bazo y la translocación de la fosfatidilserina desde el interior al exterior de la membrana plasmática ha sido identificada como una señal para la fagocitosis de las células bajo muerte programada por los macrófagos. Pruebas de la peroxidación lipídica o la externalización de la fosfatidilserina fueron detectadas por deJong et al. (1997) y McMillan et al. (2005).

La producción de ROS se asoció a la oxidación y desnaturalización de la hemoglobina y su unión a la membrana del citoesqueleto (cuerpos de Heinz). La hemólisis por daño oxidativo de los glóbulos rojos parece estar provocada más por el daño en proteínas que en los lípidos de membrana (McMillan et al., 2005).

Las vitaminas C y E contribuyen a la disminución del estrés oxidativo provocado por PHZ in vitro (Claro et al., 2006) pues inhiben la formación de metahemoglobina y de cuerpos de Heinz, pero no protegen contra el agotamiento de GSH provocado por la PHZ. La quercetina (perteneciente a una serie de pigmentos vegetales hidrosolubles llamados flavonoides) también suprime las especies reactivas de oxígeno y protege parcialmente el GSH (Luangaram et al., 2007).

La melatonina protege contra el daño oxidativo inducido a las membranas celulares por la PHZ (Karbownik et al., 2000).

La PHZ induce la formación de cuerpos de Heinz y la degradación oxidativa de la proteína espectrina por lo que se perjudica la deformabilidad eritrocitaria (Hasegawa et al., 1993). La formación de radicales fenilos es la causa de la desestabilización de la hemoglobina al inducir anemia hemolítica y cuerpos de Heinz (Nakanishi et al., 2003).

La PHZ actúa como modulador de reacciones inmunes ya que es mitógeno y activador de células linfoides (Dornfest et al., 1990).

Material y métodos

1. ANIMALES

En la realización del presente trabajo de investigación han sido utilizados un total de 20 jerbos (*Meriones unguiculatus*). El protocolo experimental fue realizado según la legislación vigente en materia de experimentación animal y recogida en la Directiva 86/609/CEE y en Real Decreto 1201/2005, de 10 de octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

Los jerbos fueron mantenidos en jaulas de policarbonato tipo III (Tecniplast, Italia), utilizando viruta de madera (Ultrasorb, Panlab, España) como cama, renovándose con una periodicidad semanal.

La adquisición de los animales se realizó a través de una casa comercial (Janvier, Francia) con suficiente tiempo de antelación a la fase experimental para procurarles una óptima aclimatación a su nuevo alojamiento y alimentación, siendo atendidos permanentemente por los mismos cuidadores.

Los jerbos fueron alojados en el Animalario Central de la Universidad de León, estando el mismo autorizado y registrado legalmente para la realización de experimentos con finalidad científica con número 24089-25A (Real Decreto 1201/2005) y mantenidos en una sala bajo estrictas condiciones ambientales (recogidas en el Anexo II de la Directiva antes mencionada) con una temperatura controlada de 20-22°C, humedad relativa de 45-60%, 10-15 renovaciones de aire/hora y ciclos luz-oscuridad de 12 horas (Cano Rábano y Ríos Granja, 1999).

La comida, dieta comercial formulada para roedores (A04 Rodent Diet, Panlab, España) y el agua de bebida (biberones de policarbonato de 500 ml con boquilla de acero inoxidable) fueron proporcionadas ad libitum.

2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Los animales fueron repartidos en 4 lotes de 5 individuos. Los jerbos contaban con una edad comprendida entre 6-7 meses al inicio del experimento y un peso medio de 75 g.

Para inducir la anemia hemolítica se administró una única dosis de clorhidrato de fenilhidracina (Sigma) a dosis de 60 mg/kg vía intraperitoneal, una vez consultada la bibliografía existente. Los animales control fueron inyectados con 0,3 ml de suero fisiológico intraperitoneal.

El protocolo de muestreo fue el que aparece en la siguiente tabla:

LOTES	A	B	C	D
DÍAS	0	1	3	6
	10	15	21	28
	36	45	55	

Las muestras se obtuvieron siempre a la misma hora (9:30-10:30 am) y alternando los grupos de manera que transcurriera el tiempo necesario para no acentuar la anemia. La cantidad extraída fue de 0,35 ml (7% de la sangre total) necesaria para realizar el hemograma, el examen morfológico del frotis sanguíneo, el recuento de reticulocitos y el análisis bioquímico del plasma sanguíneo.

Previamente, la fenilhidracina se disolvió en suero salino fisiológico (mediante agitación constante durante 10 minutos) corrigiendo el pH con NaOH hasta 7,2.

3. TOMA DE MUESTRAS SANGUÍNEAS

La sangre se extrajo del seno venoso retroorbitario (Laber-Laird, 1996) utilizando capilares de microhematocrito heparinizados, bajo una ligera anestesia de los animales con halotano (Fluothane, Zeneca Farma, España), recogándose en tubos Eppendorf® con capacidad para 1,5 ml.

TÉCNICA DE EXTRACCIÓN DE SANGRE

Material necesario

- Cámara anestésica.
- Algodón.
- Halotano (Fluothane, Zeneca Farma, España).
- Capilares de microhematocrito heparinizados.

- Tubos Eppendorf®.
- Anestésico ocular (Colicursí anestésico doble, Cusí, España).

Procedimiento:

- Anestesia ligera con halotano.
- Se coloca al animal sobre una superficie dura y se sujeta con una mano, de tal forma que el dedo índice y el pulgar se sitúen por encima y por debajo, respectivamente, de la órbita ocular, consiguiendo así la protrusión del globo ocular.
- Se introduce el capilar en el canto lateral externo del ojo, realizando simultáneamente una rotación del mismo acompañada de una ligera presión de manera que se rompa el seno y así conseguir la muestra.
- Se coloca el tubo Eppendorf por debajo del capilar de manera que la sangre gotee en el tubo.
- Finalizada la extracción se aplica una ligera hemostasia por compresión y un colirio anestésico para minimizar la irritación.

Con este procedimiento se pueden llegar a extraer 0,4-0,5 ml, siendo aconsejable no superar el 10-15% del volumen sanguíneo del animal (Morton et al., 1993).

4. ANALÍTICA SANGUÍNEA

4.1. HEMOGRAMA

Las muestras de sangre heparinizada fueron analizadas inmediatamente después de su extracción en un contador hematológico semiautomático Sysmex F-820 (TOA Instruments), siguiendo el procedimiento indicado por la casa comercial. Todos los reactivos (diluyente, detergente y hemolizante fueron suministrados por Roche Diagnostics).

El Sysmex F-820 nos proporciona los valores de hemoglobina, hematocrito, RDW y del recuento celular de hematíes, así como los índices eritrocitarios (VCM, HCM, CHCM).

4.1.1. GLÓBULOS ROJOS

Los eritrocitos son contados a partir de una dilución 1:50.000. La abertura del transductor es de 80 μm y cuenta las partículas entre 50 fl y 225 fl.

4.1.2. HEMATOCRITO

Es la relación del volumen de eritrocitos con el de la sangre total. Se expresa en %.

El contador hematológico hace una medición del hematocrito basándose en el hecho de que la altura de las pulsaciones (cambio de voltaje) producida por las células de la sangre pasando por la abertura del transductor es proporcional al volumen de la célula.

Se analizan de este modo 0,5 ml de una solución 1:50.000 de sangre entera, y al determinar el volumen acumulativo de todas las células rojas analizadas se llega a la obtención del hematocrito.

4.1.3. HEMOGLOBINA

Su medición indirecta está basada en el método de la cianometahemoglobina estandarizado internacionalmente y se expresa en g/dl.

El reactivo contiene cianuro potásico y ferricianuro potásico. El ferricianuro hace pasar el hierro de la hemoglobina del estado ferroso (Fe^{+2}) al férrico (Fe^{+3}) para formar metahemoglobina, la cual se combina con cianuro potásico y da un pigmento estable, la cianometahemoglobina.

La intensidad del color se mide a una longitud de onda de 540 nm.

4.1.4. ÍNDICES ERITROCITARIOS

Se obtienen relacionando el hematocrito, el número de hematíes y la concentración de hemoglobina.

$\text{VCM (fl)} = \text{hematocrito (\%)} \times 10 / \text{n}^\circ \text{eritrocitos (} 10^6/\text{mm}^3\text{)}$

$\text{CHCM (g/dl)} = \text{hemoglobina (g/dl)} \times 100 / \text{hematocrito (\%)}$

$\text{HCM (pg)} = \text{hemoglobina (g/dl)} \times 10 / \text{n}^\circ \text{eritrocitos (} 10^6/\text{mm}^3\text{)}$

4.1.5. ANCHO DE DISTRIBUCIÓN DE LOS GLÓBULOS ROJOS

El ancho de distribución de los glóbulos rojos (RDW, del inglés "red cell distribution width"), es una medida electrónica de la anisocitosis o de la heterogeneidad del volumen de los eritrocitos. Un histograma del volumen individual de los glóbulos rojos se aproxima a una distribución gaussiana. De esta manera se puede calcular el grado de variación en el volumen mediante la determinación de la desviación estándar (DS) del volumen de los eritrocitos. El coeficiente de variación del volumen de eritrocitos se calcula dividiendo la DS entre el VCM y multiplicando por 100. Por lo tanto, el RDW es la DS del volumen de los eritrocitos expresado como porcentaje del VCM (Meyer y Harvey, 2004).

5. EXAMEN DEL FROTIS SANGUÍNEO

Para llevar a cabo este examen es necesario:

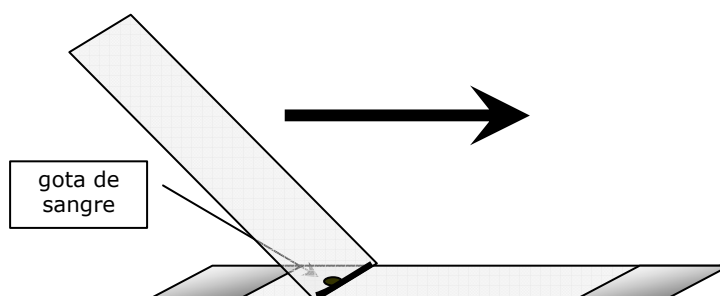
Homogeneizar la muestra de sangre en el tubo Eppendorf® mediante agitación suave manual.

Depositar una gota de sangre cerca del extremo de un portaobjetos.

Colocar otro portaobjetos por delante de la gota con una inclinación de 45°.

Retroceder hasta tocar la gota, de manera que la gota se extiende por capilaridad por todo el borde.

Realizar un movimiento rápido con una ligera presión por toda la longitud del portaobjetos como indica la figura.



Posteriormente las extensiones son teñidas con la tinción Diff Quick® suministrado por Rafael Moreo S.L. (Oviedo). Consta de 3 colorantes en los que se sumerge la extensión consecutivamente por un tiempo determinado: 1º fijador alcohólico, 2º tinción ácida roja y 3º tinción básica violeta; posteriormente se lava con agua destilada y se deja secar al aire. Para la observación de las mismas utilizamos los objetivos de 20x, 40x y 100x de un microscopio Nikon®. Con esta tinción valoramos el tipo celular, cantidad, tamaño, forma, color, formas anormales, fase de desarrollo e inclusiones celulares.

6. RECUESTO DE RETICULOCITOS

Para su identificación se realiza una tinción supravital, que tiñe el ARN como un retículo de color azul, mezclando en un tubo Eppendorf® partes iguales de sangre y de Nuevo azul de metileno (Sigma®) -1% en suero fisiológico- durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente realizamos un frotis en un portaobjetos con el producto resultante de la mezcla.

Para la correcta valoración deben contarse 1000 eritrocitos determinando cuántos de éstos son reticulocitos y expresándose como porcentaje (Voigt, 2003).

7. ANÁLITICA DEL PLASMA SANGUÍNEO

Se realizó en el autoanalizador Cobas Integra 400 de la firma comercial Roche®. Los principios en los que están basados los test son los siguientes:

7.1. LACTATO DESHIDROGENASA

La lactato-deshidrogenasa cataliza la conversión del L-Lactato a piruvato; durante el proceso, la NAD se reduce a NADH. La velocidad inicial de oxidación del NADH es directamente proporcional a la actividad catalítica de la LDH. Se determina midiendo el aumento de la absorbancia a 340 nm.

7.2. BILIRRUBINA TOTAL

Se determina mediante el método Diazo: la concentración de la bilirrubina total se determina empleando agentes tensoactivos para solubilizar la bilirrubina no conjugada (bilirrubina indirecta) y desnaturalizar su portador de albúmina. La bilirrubina conjugada y sin conjugar de la muestra reacciona con el ácido sulfanílico diazotizado en un tampón ácido para formar azobilirrubina de color rojo. La intensidad del color es proporcional a la concentración de bilirrubina directa de la muestra y se determina monitorizando el aumento de la absorbancia a 552 nm.

7.3. HIERRO

Se determina mediante el método Guanidina/Ferrozine[®]. El Fe⁺³ es liberado de la transferrina por la acción del clorhidrato de guanidina para ser reducido a Fe⁺² por el ascorbato y la hidroxilamina. Los iones de hierro bivalente forman con FerroZine[®] un quelato de color rojo. Para evitar su interferencia, los iones de cobre se fijan a la tiourea. La intensidad cromática es directamente proporcional a la concentración de hierro y se determina midiendo el incremento de la absorbancia a 552 nm.

7.4. ALANINA AMINOTRANSFERASA

Se determina mediante el método de la Federación Internacional de Química Clínica (IFCC). La ALAT cataliza la reacción entre la L-alanina y el 2-oxoglutarato. El piruvato formado se reduce por el NADH en una reacción catalizada por la lactato deshidrogenasa (LDH) para formar L-lactato y NAD⁺. El piridoxalfosfato sirve como coenzima en la transaminación, garantizando la activación enzimática completa. La velocidad de oxidación del NADH es directamente proporcional a la actividad catalítica de la ALAT. Se determina midiendo la disminución de la absorbancia a 340 nm.

7.5. ASPARTATO AMINOTRANSFERASA

Se determina mediante el método de la Federación Internacional de Química Clínica (IFCC). La ASAT cataliza la transferencia de un grupo amino entre L-aspartato y 2-oxoglutarato para obtener oxalacetato y L-glutamato. A continuación y en presencia de la malato deshidrogenasa (MDH), el oxalacetato reacciona con NADH para formar NAD⁺. El piridoxalfosfato sirve como coenzima en la transaminación, garantizando la

activación enzimática completa. La velocidad de oxidación de NADH es directamente proporcional a la actividad catalítica de la ASAT. Se determina midiendo la disminución de la absorbancia a 340 nm.

7.6. FOSFATASA ALCALINA

Se determina mediante el método de la Federación Internacional de Química Clínica (IFCC). La fosfatasa alcalina hidroliza el éster 4-nitrofenilfosfato incoloro a 4-nitrofenóxido y fosfato. El producto de la hidrólisis de la enzima, el 4-nitrofenóxido, tiene un color amarillo proporcional al valor de pH de la reacción. El 2-amino-2-metil-1-propanol funciona como aceptor de fosfato y agente tampón. La velocidad de formación de 4-nitrofenóxido es directamente proporcional a la actividad catalítica de la FA.

7.7. UREA

Se determina mediante el test cinético con ureasa y glutamato deshidrogenasa (GLDH). La urea es hidrolizada por la ureasa formando ión amonio y carbonato. En una segunda reacción, el 2-oxoglutarato reacciona con el ión amonio en presencia de la GLDH y la coenzima NADH para producir L-glutamato. En esta reacción, por cada mol de urea se oxidan dos moles de NADH. La velocidad de disminución de la concentración de NADH es directamente proporcional a la concentración de urea de la muestra. Se determina midiendo la disminución de la absorbancia a 340 nm.

7.8. CREATININA

Se determina mediante la reacción cinética Jaffé amortiguada sin desproteinización. La creatinina reacciona en una solución alcalina con picrato formando un producto de color rojo amarillento. La velocidad de formación del colorante es directamente proporcional a la concentración de creatinina en la muestra. Se determina midiendo el aumento de la absorbancia a 512 nm.

7.9. PROTEÍNA TOTAL

Se determina mediante la reacción de Biuret. El cobre divalente reacciona en medio alcalino con las uniones peptídicas de las proteínas formando el color púrpura característico del complejo Biuret. El tartrato sódico potásico impide la precipitación

de hidróxido de cobre, mientras que el yoduro potásico inhibe la autorreducción del cobre. La intensidad cromática es directamente proporcional a la concentración de la proteína. Se determina midiendo el aumento de la absorbancia a 552 nm.

7.10. ALBÚMINA

Se determina mediante el método del ensayo modificado de fijación del verde bromocresol. La albúmina, a un pH 4,3, es suficientemente catiónica para fijarse al colorante aniónico verde de bromocresol y formar un complejo de color azul-verdoso, cuya intensidad es directamente proporcional a la concentración de albúmina en la muestra. Se determina midiendo el incremento de la absorbancia a 629 nm.

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el estudio estadístico se han utilizado los programas informáticos G-Stat 2.0 (Unidad de Biometría de GSK) y el programa SAS (Statistical Analysis Software, SAS Institute Inc, Cary, EEUU).

En todos los contrastes se consideró que existían diferencias estadísticamente significativas entre los datos de los grupos a comparar cuando el valor de p era inferior a 0,05.

Los requisitos o condiciones para aplicar correctamente el análisis de la varianza (ANOVA) son: normalidad (la variable dependiente se distribuye de manera normal en cada uno de los muestreos), homocedasticidad (la varianza entre los distintos muestreos no es muy diferente, la mayor supera a la menor no más de 4 veces) e independencia de los datos (las muestras son independientes). Por ello, previamente, se realizaron las pruebas de Levene y Shapiro-Wilk para evaluar si los conjuntos de datos cumplían las condiciones de homocedasticidad y normalidad respectivamente.

En los parámetros que cumplían las condiciones de homocedasticidad y normalidad se realizó el análisis de varianza (ANOVA) de un factor y datos agrupados para los 11 días de muestreo y, si se detectaban diferencias significativas se procedía a la

realización del test de la Diferencia Mínima Significativa (LSD) de comparación de medias, para determinar entre qué días había diferencias significativas, contrastando los datos de cada día de muestreo con el día 0 y cada toma con su inmediatamente anterior.

En los parámetros que no siguieron una distribución normal o no cumplían la premisa de homocedasticidad se aplicó el test no paramétrico de comparaciones múltiples de Kruskal-Wallis para los 11 días de muestreo y si se detectaban diferencias significativas, se procedía a la comparación de las tomas de forma pareada aplicando el test de Mann-Whitney para determinar entre qué días había diferencias significativas, contrastando los datos de cada día de muestreo con el día 0 y cada toma con su inmediatamente anterior.

9. INSTALACIONES

- Departamento de Patología Animal: Medicina Veterinaria (Universidad de León).
- Animalario Central de la Universidad de León.
- Laboratorio de Técnicas Instrumentales (Universidad de León).

Resultados

1. PESO

Los valores individuales de peso (Tabla 1) oscilaron entre un mínimo de 62 g y un máximo de 84 g a lo largo del desarrollo experimental (Tabla 4).

Al comienzo del protocolo el peso medio era de $75,43 \pm 4,30$ g y al finalizar, de $77,33 \pm 1,51$ g. El valor medio más bajo se alcanzó el día 3 con $67,86 \pm 4,20$ g, aumentando progresivamente hasta su valor medio más alto el día 55 con $77,33 \pm 1,51$ g (Gráfica 1).

El estudio estadístico del peso, utilizando el test no paramétrico de comparaciones múltiples de Kruskal-Wallis, muestra la existencia de diferencias significativas ($p < 0,001$) entre tomas (Tabla 5). La comparación de los días de muestreo de forma pareada aplicando el test de Mann-Whitney indica que existen diferencias significativas, con respecto al día 0, desde el día 3 hasta el día 21 inclusive. Entre el día 28 y el 36 se observa un aumento de peso significativo ($p < 0,05$) (Tabla 6).

2. PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS

2.1. GLÓBULOS ROJOS

Los valores individuales de eritrocitos (Tabla 2) oscilaron entre un mínimo de $1,7 \times 10^6/\mu\text{l}$ y un máximo de $9,3 \times 10^6/\mu\text{l}$ a lo largo del desarrollo experimental (Tabla 4).

Al comienzo del protocolo, el valor medio era de $7,89 \pm 0,53 \times 10^6/\mu\text{l}$ y al finalizar $8,46 \pm 0,80 \times 10^6/\mu\text{l}$. El valor medio más bajo se alcanzó el día 3 con $2,30 \pm 0,60 \times 10^6/\mu\text{l}$, aumentando progresivamente hasta su valor medio más alto el día 55 con $8,46 \pm 0,80 \times 10^6/\mu\text{l}$ (Gráfica 2).

El estudio estadístico, utilizando un ANOVA de una vía, muestra la existencia de diferencias significativas ($p < 0,001$) entre tomas (Tabla 7). La comparación de las tomas de forma pareada aplicando el test LSD indica que existen diferencias significativas, con respecto al día 0, desde el día 1 hasta el día 36 inclusive, exceptuando el día 28. También aparecen diferencias significativas entre los días de muestreo 1-3 por descenso y 6-10 y 10-15 por aumento (Tabla 8).

2.2. HEMATOCRITO

Los valores individuales de hematocrito (Tabla 2) oscilaron entre un mínimo de 9,4% y un máximo de 54,3% a lo largo del desarrollo experimental (Tabla 4).

Al comienzo del protocolo, el valor medio era de $45,54 \pm 3,62\%$ y al finalizar, de $50,26 \pm 3,74\%$. El valor medio más bajo se alcanzó el día 3 con $11,94 \pm 3,00\%$, aumentando progresivamente hasta su valor medio más alto el día 55 con $50,26 \pm 3,74\%$ (Gráfica 4).

El estudio estadístico, utilizando un ANOVA de una vía, muestra la existencia de diferencias significativas ($p < 0,001$) entre tomas (Tabla 9). La comparación de las tomas de forma pareada aplicando el test LSD indica que existen diferencias significativas desde el día 1 hasta el día 10 inclusive con respecto al día 0 así como con el día 55 aunque ésta es mínima. También aparecen diferencias significativas entre los días de muestreo 1-3 y 3-6 por descenso y 6-10 y 10-15 por aumento (Tabla 10).

2.3. HEMOGLOBINA

Los valores individuales de hemoglobina (Tabla 2) oscilaron entre un mínimo de 3,60 g/dl y un máximo de 15,10 g/dl a lo largo del desarrollo experimental (Tabla 4).

Al comienzo del protocolo, el valor medio era de $13,90 \pm 0,38$ g/dl y al finalizar, de $14,43 \pm 1,06$ g/dl. El valor medio más bajo se alcanzó el día 3 con $5,12 \pm 1,84$ g/dl, aumentando progresivamente hasta su valor medio más alto el día 55 con $14,43 \pm 1,06$ g/dl (Gráfica 3).

El estudio estadístico, utilizando un ANOVA de una vía, muestra la existencia de diferencias significativas ($p < 0,001$) entre tomas (Tabla 11). La comparación de las tomas de forma pareada, aplicando el test LSD, indica que existen diferencias significativas desde el día 1 hasta el día 10 inclusive con respecto al día 0. También aparecen diferencias significativas entre los días de muestreo 1-3 y 3-6 por descenso y 6-10 y 10-15 por aumento (Tabla 12).

2.4. RETICULOCITOS

Tanto al principio como al final del protocolo, el valor de reticulocitos se mantuvo en el 3%. El recuento el día 0 fue del 3%, aumentando el día 1 hasta el 5%; el día 3, 24%; el día 6, 28% y alcanzando su valor medio más alto el día 10 con un 40%. A partir de este día comienza a descender lentamente obteniendo valores del 10%, 7%, 4% y 3% en los días 15, 21, 28 y 55, respectivamente.

2.5. VOLUMEN CORPUSCULAR MEDIO

Los valores individuales de VCM (Tabla 2) oscilaron entre un mínimo de 46,7 fl y un máximo de 89 fl a lo largo del desarrollo experimental (Tabla 4).

Al comienzo del protocolo, el valor medio era de $57,15 \pm 2,60$ fl y al finalizar, de $59,40 \pm 1,28$ fl. El valor medio más bajo se alcanzó el día 1 con $47,68 \pm 0,65$ fl y fue aumentando progresivamente hasta alcanzar su valor medio más alto el día 10 con $84,68 \pm 2,80$ fl. Posteriormente descendió lentamente hasta el día 55 (Gráfica 5).

El estudio estadístico, utilizando un ANOVA de una vía, muestra la existencia de diferencias significativas ($p < 0,001$) entre tomas (Tabla 13). La comparación de las tomas de forma pareada, aplicando el test LSD, indica que existen diferencias significativas desde el día 1 hasta el día 45 inclusive, con respecto al día 0, y entre los muestreos 1-3 por aumento y 3-6 por descenso (Tabla 14).

2.6. ANCHO DE DISTRIBUCIÓN DE LOS GLÓBULOS ROJOS

Los valores individuales de RDW (Tabla 2) oscilaron entre un mínimo de 28 y un máximo de 62% a lo largo del desarrollo experimental (Tabla 4).

Al comienzo del protocolo, el valor medio era de $28,82 \pm 0,72\%$ y al finalizar, de $30,23 \pm 1,02\%$. Fue aumentando desde el día 0 hasta alcanzar valores de $56,57 \pm 3,10\%$ el 10. Posteriormente desciende hasta alcanzar $30,23 \pm 1,02\%$ el día 55, su valor medio más bajo (Gráfica 8). El día 6 el contador hematológico no pudo calcular el RDW debido a la enorme variabilidad en el VCM de los eritrocitos en ese día.

El estudio estadístico, utilizando un ANOVA de una vía, muestra la existencia de diferencias significativas ($p < 0,001$) entre tomas (Tabla 15). La comparación de las tomas de forma pareada, aplicando el test LSD, indica que existen diferencias significativas desde el día 3 hasta el día 45 inclusive con respecto al día 0 y entre los muestreos 1-3, 3-10 por aumento y 15-21, 21-28 y 28-36 por descenso (Tabla 16).

2.7. HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MEDIA

Los valores individuales de HCM (Tabla 2) oscilaron entre un mínimo de 16,2 pg y un máximo de 36,8 pg, a lo largo del desarrollo experimental (Tabla 4).

Al comienzo del protocolo el valor medio era de $17,6 \pm 0,70$ pg y al finalizar, de $17,03 \pm 1,30$ pg. Aumentó su valor desde el día 0, paulatinamente, hasta alcanzar su valor medio más alto el día 6 con $27,37 \pm 1,37$ pg. Posteriormente descendió hasta el día 55 cuando se obtuvo el valor medio más bajo con $17,03 \pm 1,30$ pg (Gráfica 6).

El estudio estadístico, utilizando un ANOVA de una vía, muestra la existencia de diferencias significativas ($p < 0,001$) entre tomas (Tabla 17). La comparación de las tomas de forma pareada aplicando el test LSD indica que existen diferencias significativas desde el día 3 hasta el día 10 inclusive con respecto al día 0 y entre los muestreos 3-6 por aumento (Tabla 18).

2.8. CONCENTRACIÓN DE HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MEDIA

Los valores individuales de CHCM (Tabla 2) oscilaron entre un mínimo de 37,7 g/dl y un máximo de 71,1 g/dl a lo largo del desarrollo experimental (Tabla 4).

Al comienzo del protocolo, el valor medio era de $30,60 \pm 1,66$ g/dl y al finalizar, de $28,70 \pm 1,30$ g/dl. Aumentó su valor desde el día 0 hasta alcanzar su valor medio más alto el día 3 con $43,70 \pm 15,60$ g/dl. Posteriormente descendió hasta el día 55 cuando se obtuvo el valor medio más bajo con $28,70 \pm 1,30$ g/dl (Gráfica 7).

El estudio estadístico, utilizando un ANOVA de una vía, muestra la existencia de diferencias significativas ($p < 0,01$) entre tomas (Tabla 19). La comparación de las

tomas de forma pareada, aplicando el test LSD, indica que existen diferencias significativas desde el día 1 hasta el día 3 inclusive con respecto al día 0 y entre los muestreos 3-6 por descenso (Tabla 20).

3. PARÁMETROS BIOQUÍMICOS

3.1. LACTATO DESHIDROGENASA

Los valores individuales de LDH (Tabla 3) oscilaron entre un mínimo de 64 U/l y un máximo de 4.246 U/l a lo largo del desarrollo experimental (Tabla 4).

Al comienzo del protocolo, el valor medio era de $365,90 \pm 230$ U/l y al finalizar, de $514,63 \pm 391$ U/l. Del día 0 al día 1 se produjo el incremento más brusco alcanzando valores de $3.511,20 \pm 588$ U/l. Posteriormente se produjo un descenso rápido hasta $953,50 \pm 523$ U/l el día 3, para subir de nuevo el día 6 hasta 1348 ± 636 U/l y disminuir el día 10 manteniéndose en esos valores hasta el final (Gráfica 8).

El estudio estadístico, utilizando un ANOVA de una vía, muestra la existencia de diferencias significativas ($p < 0,001$) entre tomas (Tabla 21). La comparación de las tomas de forma pareada, aplicando el test LSD, indica que existen diferencias significativas desde el día 1 hasta el día 6 inclusive con respecto al día 0 y entre los muestreos 1-3 y 3-6 por descenso (Tabla 22).

3.2. BILIRRUBINA TOTAL

Los valores individuales de bilirrubina total (Tabla 3) oscilaron entre un mínimo de 0,3 mg/dl y un máximo de 10,6 mg/dl a lo largo del desarrollo experimental (Tabla 4).

Al comienzo del protocolo, el valor medio era de $0,60 \pm 0,19$ mg/dl y al finalizar, de $0,86 \pm 0,37$ mg/dl. Su valor aumentó bruscamente desde el día 0 hasta su valor medio más alto, el día 3, con $3,84 \pm 3,88$ mg/dl, para descender rápidamente el día 10 a valores normales de $0,76 \pm 0,19$ mg/dl y mantenerse así hasta la finalización del protocolo (Gráfica 10).

El estudio estadístico, utilizando un ANOVA de una vía, muestra la existencia de diferencias significativas ($p < 0,01$) entre tomas (Tabla 23). La comparación de las

tomas, de forma pareada aplicando el test LSD, indica que existen diferencias significativas desde el día 1 hasta el día 3 inclusive con respecto al día 0 y entre los muestreos 3-6 por descenso (Tabla 24).

3.3. HIERRO

Los valores individuales de hierro (Tabla 3) oscilaron entre un mínimo de 86,00 µg/dl y un máximo de 613,50 µg/dl a lo largo del desarrollo experimental (Tabla 4).

Al comienzo del protocolo el valor medio era de $270,63 \pm 45,81$ µg/dl y al finalizar de $193,70 \pm 46,20$ µg/dl. Su valor aumentó desde el día 0 hasta su valor medio más alto el día 1 con $541,27 \pm 77,77$ µg/dl. Posteriormente, el día 3 descendió hasta $251,19 \pm 79,78$ µg/dl; volvió a elevarse el día 6 con $348,91 \pm 88,00$ µg/dl; los días 10 y 15 sufrió un descenso pronunciado, por debajo de los valores normales y alcanzó los $179,06 \pm 57,60$ y $142,19 \pm 56,82$ µg/dl, respectivamente. A partir de ese momento se mantuvo dentro de la normalidad hasta la finalización del protocolo (Gráfica 11).

El estudio estadístico, utilizando un ANOVA de una vía, muestra la existencia de diferencias significativas ($p < 0,001$) entre tomas (Tabla 25). La comparación de las tomas, de forma pareada aplicando el test LSD, indica que existen diferencias significativas el día 0-1, 3-6 y 15-21 por aumento y entre los muestreos 0-10 0-15, 1-3 y 6-10 por descenso (Tabla 26).

3.4. ALANINA AMINOTRANSFERASA

Los valores individuales de ALAT (Tabla 3) oscilaron entre un mínimo de 46,6 U/l y un máximo de 527,2 U/l a lo largo del desarrollo experimental (Tabla 4).

Al comienzo del protocolo, el valor medio era de $97,24 \pm 49,56$ U/l y al finalizar de $85,90 \pm 12,10$ U/l. Su valor aumentó desde el día 0 hasta el día 1 alcanzando en ese día su valor más alto con $397,76 \pm 86,88$ U/l. Posteriormente continuó descendiendo hasta el día 10 con 78,00 U/l, manteniéndose en estos valores hasta el final (Gráfica 12).

El estudio estadístico, utilizando el test no paramétrico de comparaciones múltiples de Kruskal-Wallis, muestra la existencia de diferencias significativas ($p < 0,001$) entre

tomas (Tabla 27). La comparación de los días de muestreo de forma pareada, aplicando el test de Mann-Whitney, indica que existen diferencias significativas desde el día 1 hasta el día 6 inclusive con respecto al día 0 y entre los muestreos 6-10 por descenso (Tabla 28).

3.5. ASPARTATO AMINOTRANSFERASA

Los valores individuales de ASAT (Tabla 3) oscilaron entre un mínimo de 142 U/l y un máximo de 844,6 U/l a lo largo del desarrollo experimental (Tabla 4).

Al comienzo del protocolo el valor medio era de $199,48 \pm 63,50$ U/l y al finalizar, de $251,90 \pm 30,30$ U/l. Su valor aumentó desde el día 0 hasta su valor medio más alto el día 1 con $564,88 \pm 126,67$ U/l, manteniéndose en esos valores hasta descender el día 10 hasta $188,93 \pm 26,80$ U/l y manteniéndose en esos valores hasta el final del protocolo (Gráfica 13).

El estudio estadístico, utilizando el test no paramétrico de comparaciones múltiples de Kruskal-Wallis, muestra la existencia de diferencias significativas ($p < 0,01$) entre tomas (Tabla 29). La comparación de los días de muestreo, de forma pareada aplicando el test de Mann-Whitney, indica que existen diferencias significativas desde el día 1 hasta el día 6 inclusive con respecto al día 0 y entre los muestreos 6-10 por descenso (Tabla 30).

3.6. FOSFATASA ALCALINA

Los valores individuales de fosfatasa alcalina (Tabla 3) oscilaron entre un mínimo de 32,6 U/l y un máximo de 107,4 U/l a lo largo del desarrollo experimental (Tabla 4).

Al comienzo del protocolo el valor medio era de $89,44 \pm 11,73$ U/l y al finalizar, de $72,80 \pm 7,83$ U/l. Su valor descendió desde el día 0 hasta el día 6 cuando alcanza su valor medio más bajo con $42,50 \pm 10,35$ U/l, para posteriormente aumentar progresivamente hasta el día 45 con $88,7 \pm 3,21$ U/l (Gráfica 14).

El estudio estadístico, utilizando un ANOVA de una vía, muestra la existencia de diferencias significativas ($p < 0,001$) entre tomas (Tabla 31). La comparación de las tomas de forma pareada, aplicando el test LSD, indica que existen diferencias

significativas desde el día 3 hasta el día 28 inclusive con respecto el día 0 y entre los muestreos 1-3 por descenso y 10-15 por aumento (Tabla 32).

3.7. UREA

Los valores individuales de urea (Tabla 3) oscilaron entre un mínimo de 22,4 mg/dl y un máximo de 69,4 mg/dl a lo largo del desarrollo experimental (Tabla 4).

Al comienzo del protocolo el valor medio era de $40,56 \pm 8,95$ mg/dl y al finalizar de $42,20 \pm 7,98$ mg/dl. El valor medio más bajo se alcanzó el día 1 con $28,00 \pm 4,69$ mg/dl, y el valor medio más alto el día 3 con $47,04 \pm 11,39$ mg/dl (Gráfica 15).

El estudio estadístico, utilizando un ANOVA de una vía, no muestra la existencia de diferencias significativas entre tomas (Tabla 33).

3.8. CREATININA

Los valores individuales de creatinina (Tabla 3) oscilaron entre un mínimo de 0,3 mg/dl y un máximo de 0,6 mg/dl a lo largo del desarrollo experimental (Tabla 4).

Al comienzo del protocolo el valor medio era de $0,41 \pm 0,03$ mg/dl y al finalizar, de $0,41 \pm 0,04$ mg/dl. Aumentó su valor desde el día 0 hasta alcanzar su valor medio más alto el día 1 con $0,59 \pm 0,04$ mg/dl. Posteriormente descendió de forma progresiva hasta el día 10 obteniendo $0,39 \pm 0,01$ mg/dl, manteniéndose en esos valores hasta el final del protocolo (Gráfica 16).

El estudio estadístico, utilizando el test no paramétrico de comparaciones múltiples de Kruskal-Wallis, muestra la existencia de diferencias significativas ($p < 0,01$) entre tomas (Tabla 34). La comparación de los días de muestreo de forma pareada, aplicando el test de Mann-Whitney, indica que existen diferencias significativas el día 1 y el día 6 con respecto el día 0 (Tabla 35).

3.9. PROTEÍNA TOTAL

Los valores individuales de proteína total (Tabla 3) oscilaron entre un mínimo de 3,7 g/dl y un máximo de 6,6 g/dl a lo largo del desarrollo experimental (Tabla 4).

Al comienzo del protocolo el valor medio era de $4,92 \pm 0,31$ g/dl y al finalizar, de $5,24 \pm 0,47$ g/dl. El valor medio más bajo se alcanzó el día 21 con $4,47 \pm 0,65$ g/dl, aumentando progresivamente hasta alcanzar su valor medio más alto el día 55 con $5,24 \pm 0,47$ g/dl (Gráfica 17).

El estudio estadístico, utilizando el test no paramétrico de comparaciones múltiples de Kruskal-Wallis, muestra que no existen diferencias significativas entre tomas (Tabla 36).

3.10. ALBÚMINA

Los valores individuales de albúmina (Tabla 3) oscilaron entre un mínimo de 1 g/dl y un máximo de 2,7 g/dl a lo largo del desarrollo experimental (Tabla 4).

Al comienzo del protocolo el valor medio era de $2,16 \pm 0,21$ g/dl y al finalizar, de $2,51 \pm 0,34$ g/dl. El valor medio más bajo se alcanzó el día 10 con $1,67 \pm 0,23$ g/dl y el valor medio más alto, el día 55 con $2,51 \pm 0,34$ g/dl (Gráfica 18).

El estudio estadístico, utilizando un ANOVA de una vía, no muestra la existencia de diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tomas (Tabla 37).

4. EXTENSIONES SANGUÍNEAS

Día 1

En el frotis de sangre teñido con Diff Quick® aparece anisocitosis y poiquilocitosis con equinocitosis (probablemente debida a un fenómeno de crenación) y cuerpos de Heinz de gran tamaño. También se aprecia policromasia, punteado basofílico y existencia de esquistocitos (glóbulos rojos lisados). En el frotis teñido con Nuevo azul de metileno aparecen reticulocitos, algunos esquistocitos y glóbulos rojos con múltiples cuerpos de Heinz en su interior.

Día 3

En frotis teñido con Diff Quick® se observa anisocitosis, incremento de la policromasia respecto al día 1, microcitos irregulares y equinocitos. Con tinción NAM

aparecen numerosos cuerpos de Heinz y mayor cantidad de reticulocitos que el día 1.

Día 6

Con tinción Diff Quick[®], aparece un prominente punteado basofílico celular, algunos queratocitos, esquistocitos, equinocitos y cuerpos de Heinz. Con tinción NAM, observamos que existen dos poblaciones diferentes de glóbulos rojos, una de células pequeñas y azules y otra de células grandes más teñidas que a veces tienen una o más inclusiones basofílicas periféricas que parecen irregulares; las más pequeñas tienen múltiples cuerpos de Heinz en su interior.

Día 10

Con tinción Diff Quick[®] observamos un menor número de eritrocitos con punteado basofílico, mayor uniformidad en las células, presencia de algún microesferocito y excentrocitos. Con NAM se aprecia una menor anisocitosis aunque con una mayor existencia de macrocitosis y muchos reticulocitos agregados.

Día 15

Con tinción Diff Quick[®] observamos que sigue disminuyendo la anisocitosis, pocos microesferocitos, menor punteado basofílico, menor número de reticulocitos, algún glóbulo rojo hipocrómico y algún queratocito.

Día 21

Disminución de los fenómenos indicativos de regeneración (reticulocitos y eritrocitos con punteado basofílico)

Día 28, 36, 45 y 55

Normalidad

TABLAS

PESO										
0	1	3	6	10	15	21	28	36	45	55
75	72	67	64	68	72	74	76	75	75	76
83	82	66	70	72	72	72	74	79	77	78
84	81	69	70	76	69	70	70	74	75	77
74	71	71	72	72	73	75	74	74	75	76
71	70	66	68	77	72	70	69	77	79	77
77	73	68	71	74	73	68	71	77	74	80
75	74	74	72	71	66	71	75	75	79	
75	70	63	72	71	73	68	75	75	75	
75	74	62	67	72	75	71	73	74		
67	66	70	73	67	74	74	71			
77	70	72	75	72	69	70				
75	71	62	64							
73	70	75	62							
75	73	65								

Tabla nº 1. Valores individuales de peso, expresado en gramos, de los animales a lo largo del experimento.

DIA	ANIMAL	GR	HTO	HB	VCM	RDW	HCM	CHCM
0	A1	7,8	45,1	14,0	57,7	28,4	17,9	31,0
0	A2	7,3	42,0	13,5	57,6	28,0	18,5	32,1
0	A3	7,6	42,8	13,5	56,4	28,7	17,8	31,5
0	A4	8,6	46,7	14,3	54,5	29,1	16,7	30,6
0	A5	8,3	51,1	14,2	61,6	29,9	17,1	27,8
1	B1	4,8	23,0	11,8	48,3	31,7	24,8	51,3
1	B2	6,1	29,0	10,2	47,8	34,3	16,8	35,2
1	B3	6,1	28,8	10,1	47,4	33,1	16,6	35,1
1	B4	4,9	23,7	10,0	48,2	30,7	20,3	42,2
1	B5	4,5	21,1	8,5	46,7	ND	18,8	40,3
3	C1	2,2	11,4	8,1	51,8	40,9	36,8	71,1
3	C2	3,2	16,8	5,7	52,2	46,2	17,7	33,9
3	C3	1,7	9,4	3,9	54,3	43,3	22,5	41,5
3	C4	2,5	12,6	4,3	50,0	39,2	17,1	34,1
3	C5	1,8	9,5	3,6	51,6	37,5	19,6	37,9
6	D1	2,3	18,4	6,8	78,0	ND	28,8	37,0
6	D2	2,1	18,4	5,7	87,6	ND	27,1	31,0
6	D3	2,9	23,7	7,3	81,2	ND	25,0	30,8
6	D4	2,5	21,8	7,0	89,0	ND	28,6	32,1
10	A1	4,8	39,2	12,0	81,3	57,5	24,9	30,6
10	A2	4,8	40,5	12,2	84,0	59,1	25,3	30,1
10	A3	4,3	36,7	11,4	85,3	53,1	26,5	31,1
10	A4	4,1	36,3	11,1	88,1	ND	26,9	30,6
15	B1	5,6	42,3	13,2	75,7	62,0	23,6	31,2
15	B2	6,8	50,6	14,3	74,0	57,4	20,9	28,3
15	B3	6,2	45,8	13,5	74,2	54,8	21,9	29,5
15	B5	7,0	48,4	13,5	69,5	47,5	19,4	27,9
21	C2	6,8	48,2	13,9	70,6	53,3	20,4	28,8
21	C3	6,7	47,8	13,5	71,7	48,6	20,2	28,2
21	C4	6,7	47,6	14,2	71,2	49,4	20,6	29,1
21	C5	6,6	47,3	14,5	71,7	48,9	22,0	30,7
28	D1	8,0	52,0	14,8	65,2	41,7	18,5	28,5
28	D2	7,5	48,5	15,1	64,8	40,9	20,2	31,1
28	D3	6,8	44,8	13,3	66,2	43,2	19,6	29,7
28	D4	6,8	44,0	13,7	65,0	44,7	20,2	31,1
36	A1	6,5	40,5	12,7	62,5	39,9	19,5	31,4
36	A2	6,3	40,4	11,8	63,9	40,0	18,7	29,2
36	A3	7,5	48,0	13,7	63,9	37,5	18,2	28,5
36	A4	7,6	45,9	14,1	60,3	35,1	18,5	30,7
45	B2	8,4	50,5	14,0	60,3	34,2	16,7	27,7
45	B3	7,4	45,2	14,0	61,0	33,8	18,9	31,0
45	B5	8,1	48,2	13,9	60,8	34,1	17,4	28,4
55	C2	9,3	54,3	15,1	58,3	30,5	16,2	27,8
55	C3	7,7	46,9	13,2	60,8	29,1	17,1	28,1
55	C4	8,4	49,6	15,0	59,0	31,1	17,8	30,2

Tabla nº 2. Valores individuales de glóbulos rojos (expresados en $10^6/\mu\text{l}$), hematocrito (%), hemoglobina (g/dl), VCM (fl), RDW (%), HCM (pg) y CHCM (g/dl).

DIA	ANIMAL	LDH	BILT	HIERRO	ALAT	ASAT	FA	UREA	CREA	PT	ALB
0	A1	202	0,6	226,8	180,4	294,8	107,4	34,8	0,4	5,3	2,2
0	A2	514	0,8	340,8	63,6	159,4	76,0	49,6	0,4	4,5	2,0
0	A3	668	0,7	264,8	106,0	233,4	93,0	31,6	0,4	5,0	1,9
0	A4	346	0,6	286,1	69,8	167,8	86,4	50,8	0,4	4,7	2,3
0	A5	98	0,3	234,7	66,4	142,0	84,4	36,0	0,4	5,1	2,4
1	B1	3284	6,5	613,5	336,8	506,8	78,6	34,0	0,6	3,9	2,4
1	B2	4004	2,9	568,8	527,2	702,2	73,8	31,2	0,6	6,6	2,6
1	B3	4246	2,1	412,3	437,0	693,8	77,6	24,8	0,6	5,6	2,3
1	B4	3172	2,1	579,9	378,4	503,6	84,8	22,4	0,5	5,6	2,1
1	B5	2850	4,7	531,9	309,4	418,0	71,6	27,6	0,6	4,2	1,7
3	C1	296	10,6	374,3	293,8	335,4	58,2	34,6	0,4	4,3	2,3
3	C2	954	3,0	202,2	239,0	257,8	58,2	49,6	0,4	4,1	1,8
3	C3	1026	2,8	163,1	317,2	615,8	32,6	44,0	0,6	5,0	1,9
3	C4	752	1,2	262,6	411,6	688,2	59,6	65,0	0,6	5,1	2,2
3	C5	1740	1,5	253,6	394,0	844,6	43,0	42,0	0,5	5,1	2,1
6	D1	1332	1,1	265,9	288,6	633,6	53,6	43,2	0,5	5,0	2,0
6	D2	596	1,1	471,5	193,6	303,2	49,0	35,0	0,5	5,6	2,6
6	D3	1312	1,3	312,9	170,0	564,0	33,0	31,2	0,4	4,7	1,5
6	D4	2152	1,8	345,3	267,2	726,0	34,4	35,2	0,5	5,0	2,0
10	A1	340	0,8	153,1	94,2	224,2	57,6	42,6	0,4	4,7	1,5
10	A2	366	0,5	110,6	86,0	183,4	70,8	27,6	0,4	4,6	2,0
10	A3	408	0,8	217,9	78,0	188,9	38,8	39,4	0,4	5,1	1,6
10	A4	518	0,9	234,7	53,8	159,2	56,4	39,2	0,4	4,4	1,5
15	B1	482	0,6	86,0	63,4	170,6	68,4	44,0	0,5	4,5	1,5
15	B2	1258	1,2	168,7	100,8	294,4	76,0	35,6	0,4	4,8	2,0
15	B3	290	0,4	105,0	68,2	196,8	73,6	39,2	0,4	5,2	2,5
15	B5	1050	0,8	209,0	87,4	320,2	74,0	44,4	0,5	4,8	2,0
21	C2	706	1,1	217,9	92,0	257,4	78,2	42,6	0,4	5,3	2,3
21	C3	310	0,6	248,1	52,6	179,6	75,0	36,0	0,3	3,7	1,2
21	C4	580	0,9	236,9	75,4	190,2	72,3	45,2	0,4	4,4	1,8
21	C5	700	1,0	242,5	81,2	162,6	64,0	62,6	0,4	4,5	2,1
28	D1	248	0,6	154,2	73,2	169,2	72,0	45,6	0,4	4,8	2,4
28	D2	878	1,0	232,4	121,4	276,6	50,6	39,4	0,4	3,7	1,6
28	D3	242	0,4	193,3	60,0	194,6	75,6	33,4	0,3	4,3	1,6
28	D4	418	0,8	191,1	46,6	159,0	84,2	69,4	0,5	5,2	2,5
36	A1	1118	1,4	177,7	122,6	411,8	67,6	40,6	0,4	4,9	2,1
36	A2	690	1,0	192,2	76,6	205,0	72,0	41,2	0,4	4,5	1,9
36	A3	624	0,9	234,7	82,2	253,1	83,6	46,8	0,4	4,9	2,1
36	A4	64	0,3	201,1	47,4	142,6	82,4	38,6	0,4	5,2	2,5
45	B2	642	1,2	260,4	88,4	326,0	85,0	36,0	0,4	4,9	2,1
45	B3	380	0,7	167,6	84,0	247,6	87,8	36,8	0,4	5,3	2,1
45	B5	118	0,3	147,5	79,6	169,2	91,4	36,0	0,4	4,8	2,1
55	C2	86	0,4	143,0	85,9	251,9	65,4	37,2	0,4	4,7	2,1
55	C3	854	1,0	204,5	98,0	282,2	72,0	38,0	0,4	5,4	2,7
55	C4	604	1,1	233,5	73,8	221,6	81,0	51,4	0,5	5,6	2,7

Tabla nº 3. Valores individuales de LDH (expresados en U/l), BILT (mg/dl), hierro (µg/dl), ALAT (U/l), ASAT (U/l), FA (U/l), urea (mg/dl), creatinina (mg/dl), proteína total (g/dl) y albúmina (g/dl).

PARÁMETRO	MUESTRAS	MEDIA	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	MÍNIMO	MÁXIMO
PESO	121	72,4	4,22	62,0	84,0
GR	45	5,8	2,14	1,7	9,3
HB	45	11,6	3,34	3,6	15,1
HTO	45	37,4	13,45	9,4	54,3
VCM	45	64,7	12,10	46,7	89
HCM	45	20,8	4,24	16,2	36,8
CHCM	45	32,8	7,40	27,7	71,1
RDW	39	40,7	9,80	28,0	62,0
LDH	45	967	1022	64,0	4246
BILT	45	1,5	1,80	0,3	10,6
HIERRO	45	46,4	22,40	86,0	613,1
ALAT	45	158,3	127,5	46,6	527,2
ASAT	45	325,1	191,82	142	844,6
FA	45	69,5	16,70	32,6	107,4
UREA	45	40,2	9,50	22,4	69,4
CREA	45	0,44	0,08	0,3	0,6
PT	45	4,85	0,55	3,7	6,6
ALB	45	2,06	0,36	1,0	2,7

Tabla nº 4. Valores estadísticos simples de los animales a lo largo del experimento.

PESO		
Día	media	DS
0	75,43	4,30
1	72,64	4,30
3	67,86	4,20
6	69,23	4,00
10	72,00	3,00
15	71,64	2,60
21	71,18	2,40
28	72,80	2,39
36	75,56	1,74
45	76,13	1,96
55	77,33	1,51
Chi ²	46,85	
p	*** (0,0001)	

PESO			
Contraste	Z (contraste de hipótesis)	p (por los dos lados)	
0 - 1	1,70	0,09	
0 - 3	-3,04	0,01	♦
0 - 6	-2,70	0,01	♦
0 - 10	-2,02	0,04	♦
0 - 15	-2,02	0,04	♦
0 - 21	-2,04	0,04	♦
0 - 28	-1,21	0,23	
0 - 36	0,33	0,74	
0 - 45	0,76	0,44	
0 - 55	1,70	0,09	
1 - 3	-1,96	0,04	♦
3 - 6	1,07	0,28	
6 - 10	1,59	0,11	
10 - 15	-0,17	0,87	
15 - 21	0,60	0,55	
21 - 28	1,42	0,15	
28 - 36	2,20	0,02	♦
36 - 45	0,71	0,48	
45 - 55	1,38	0,17	

Tabla nº 5. Valores de peso (g) de los animales a lo largo del experimento, expresados como valor medio \pm desviación estándar. La tabla muestra el test de comparaciones múltiples de Kruskal-Wallis entre tomas señalándose el nivel de significación estadística mediante asteriscos (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$).

Tabla nº 6. Test de Mann-Whitney para el peso, comparando todas las tomas con la toma inicial (día 0), y cada toma con su inmediata anterior; ♦ indica diferencias estadísticamente significativas entre ellas con $p < 0,05$.

Glóbulos Rojos		
Día	media	DS
0	7,89	0,53
1	5,27	0,76
3	2,30	0,60
6	2,46	0,33
10	4,52	0,35
15	6,39	0,63
21	6,70	0,08
28	7,27	0,58
36	6,99	0,67
45	7,96	0,51
55	8,46	0,80
$F_{(10,34)}$	58,97	
p	*** (0,0002)	

Glóbulos Rojos		
Contraste días	Diferencia	Límite
0 - 1	♦2,62	±0,73
0 - 3	♦5,59	±0,73
0 - 6	♦5,43	±0,77
0 - 10	♦3,37	±0,77
0 - 15	♦1,50	±0,77
0 - 21	♦1,19	±0,77
0 - 28	0,62	±0,77
0 - 36	♦0,90	±0,77
0 - 45	-0,07	±0,84
0 - 55	-0,57	±0,84
1 - 3	♦2,97	±0,73
3 - 6	-0,16	±0,77
6 - 10	♦-2,06	±0,81
10 - 15	♦-1,87	±0,81
15 - 21	-0,31	±0,81
21 - 28	-0,57	±0,81
28 - 36	0,28	±0,81
36 - 45	♦-0,97	±0,88
45 - 55	-0,50	±0,94

Tabla nº 7. Valores de glóbulos rojos ($10^6/\mu\text{l}$) de los animales a lo largo del experimento, expresados como valor medio \pm desviación estándar. La tabla muestra el análisis de varianza entre tomas señalándose el nivel de significación estadística mediante asteriscos (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$).

Tabla nº 8. Test de la diferencia mínima significativa (LSD) para los valores de glóbulos rojos, comparando todas las tomas con la toma inicial (día 0), y cada toma con su inmediata anterior; ♦ indica diferencias estadísticamente significativas entre ellas con $p < 0,05$.

Hematocrito		
Día	media	DS
0	45,54	3,62
1	25,12	3,60
3	11,94	3,00
6	20,57	2,62
10	38,18	2,00
15	46,80	3,60
21	47,77	0,37
28	46,42	3,68
36	43,70	3,84
45	47,96	2,65
55	50,26	3,74
$F_{(10,34)}$	75,74	
p	*** (0,0003)	

Hematocrito		
Contraste días	Diferencia	Límite
0 - 1	♦20,32	±4,06
0 - 3	♦33,50	±4,06
0 - 6	♦24,87	±4,30
0 - 10	♦7,26	±4,30
0 - 15	-1,36	±4,30
0 - 21	-2,33	±4,30
0 - 28	-0,98	±4,30
0 - 36	1,74	±4,30
0 - 45	-2,52	±4,69
0 - 55	♦-4,82	±4,69
1 - 3	♦13,18	±4,06
3 - 6	♦-8,63	±4,30
6 - 10	♦-17,61	±4,54
10 - 15	♦-8,62	±4,54
15 - 21	-0,97	±4,54
21 - 28	1,35	±4,54
28 - 36	2,72	±4,54
36 - 45	-4,26	±4,90
45 - 55	-2,30	±5,24

Tabla nº 9. Valores de hematocrito (%) de los animales a lo largo del experimento, expresados como valor medio \pm desviación estándar. La tabla muestra el análisis de varianza entre tomas señalándose el nivel de significación estadística mediante asteriscos (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$).

Tabla nº 10. Test de la diferencia mínima significativa (LSD) para los valores de hematocrito, comparando todas las tomas con la toma inicial (día 0), y cada toma con su inmediata anterior; ♦ indica diferencias estadísticamente significativas entre ellas con $p < 0,05$.

Hemoglobina		
Día	media	DS
0	13,90	0,38
1	10,12	1,16
3	5,12	1,84
6	6,70	0,69
10	11,68	0,50
15	13,63	0,50
21	13,97	0,42
28	14,22	0,86
36	13,08	1,03
45	14,00	0,05
55	14,43	1,06
F _(10,34)	51,07	
p	*** (0,0002)	

Hemoglobina		
Contraste días	Diferencia	Límite
0 - 1	♦3,78	±1,22
0 - 3	♦8,78	±1,22
0 - 6	♦7,20	±1,29
0 - 10	♦2,22	±1,29
0 - 15	0,27	±1,29
0 - 21	-0,07	±1,29
0 - 28	-0,32	±1,29
0 - 36	0,82	±1,29
0 - 45	-0,10	±1,41
0 - 55	-0,53	±1,41
1 - 3	♦5,00	±1,22
3 - 6	♦-1,58	±1,29
6 - 10	♦-4,98	±1,36
10 - 15	♦-1,95	±1,36
15 - 21	-0,34	±1,36
21 - 28	-0,25	±1,36
28 - 36	1,14	±1,36
36 - 45	-0,92	±1,47
45 - 55	-0,43	±1,57

Tabla nº 11. Valores de hemoglobina (g/dl) de los animales a lo largo del experimento, expresados como valor medio \pm desviación estándar. La tabla muestra el análisis de varianza entre tomas señalándose el nivel de significación estadística mediante asteriscos (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$).

Tabla nº 12. Test de la diferencia mínima significativa (LSD) para los valores de hemoglobina, comparando todas las tomas con la toma inicial (día 0), y cada toma con su inmediata anterior; ♦ indica diferencias estadísticamente significativas entre ellas con $p < 0,05$.

VCM		
Día	media	DS
0	57,15	2,60
1	47,68	0,65
3	51,98	1,54
6	83,95	5,22
10	84,68	2,80
15	73,40	2,70
21	71,30	0,52
28	65,28	0,62
36	62,65	1,70
45	60,65	0,36
55	59,40	1,28
$F_{(10,34)}$	118,37	
p	*** (0,0002)	

VCM		
Contraste días	Diferencia	Límite
0 - 1	♦9,47	±2,95
0 - 3	♦5,17	±2,95
0 - 6	♦-26,80	±3,13
0 - 10	♦-27,53	±3,13
0 - 15	♦-16,25	±3,13
0 - 21	♦-14,15	±3,13
0 - 28	♦-8,13	±3,13
0 - 36	♦-5,50	±3,13
0 - 45	♦-3,50	±3,41
0 - 55	-2,25	±3,41
1 - 3	♦-4,30	±2,95
3 - 6	♦-31,97	±3,13
6 - 10	-0,73	±3,30
10 - 15	♦11,28	±3,30
15 - 21	2,10	±3,30
21 - 28	♦8,65	±3,30
28 - 36	2,63	±3,30
36 - 45	2,00	±3,57
45 - 55	1,25	±3,81

Tabla nº 13. Valores de VCM (fl) de los animales a lo largo del experimento, expresados como valor medio \pm desviación estándar. La tabla muestra el análisis de varianza entre tomas señalándose el nivel de significación estadística mediante asteriscos (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$).

Tabla nº 14. Test de la diferencia mínima significativa (LSD) para los valores de VCM, comparando todas las tomas con la toma inicial (día 0), y cada toma con su inmediata anterior; ♦ indica diferencias estadísticamente significativas entre ellas con $p < 0,05$.

RDW		
Día	media	DS
0	28,82	0,72
1	32,45	1,57
3	41,42	3,42
6		
10	56,57	3,10
15	55,40	6,06
21	50,27	2,19
28	42,70	1,68
36	38,13	2,30
45	34,00	0,21
55	30,23	1,02
F _(10,34)	49,39	
p	*** (0,0003)	

RDW		
Contraste días	Diferencia	Límite
0 - 1	-3,63	±3,83
0 - 3	♦-12,60	±3,62
0 - 10	♦-27,75	±4,17
0 - 15	♦-26,58	±3,83
0 - 21	♦-21,45	±3,83
0 - 28	♦-13,88	±3,83
0 - 36	♦-9,31	±3,83
0 - 45	♦-5,18	±4,17
0 - 55	-1,41	±4,17
1 - 3	♦-8,97	±3,83
3 - 10	♦-15,15	±4,17
10 - 15	1,17	±4,37
15 - 21	♦5,13	±4,04
21 - 28	♦7,57	±4,04
28 - 36	♦4,57	±4,04
36 - 45	4,13	±4,37
45 - 55	3,77	±4,67

Tabla nº 15. Valores de RDW (%) de los animales a lo largo del experimento, expresados como valor medio \pm desviación estándar. La tabla muestra el análisis de varianza entre tomas señalándose el nivel de significación estadística mediante asteriscos (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$).

Tabla nº 16. Test de la diferencia mínima significativa (LSD) para los valores de RDW, comparando todas las tomas con la toma inicial (día 0), y cada toma con su inmediata anterior; ♦ indica diferencias estadísticamente significativas entre ellas con $p < 0,05$.

HCM		
Día	media	DS
0	17,60	0,70
1	19,46	3,35
3	22,74	8,10
6	27,37	1,75
10	25,90	0,95
15	21,45	1,76
21	20,87	0,81
28	19,62	0,80
36	18,73	1,25
45	17,66	1,73
55	17,03	1,30
$F_{(10,34)}$	4,53	
p	*** (0,0004)	

HCM		
Contraste días	Diferencia	Límite
0 - 1	-1,86	±4,06
0 - 3	♦-5,14	±4,06
0 - 6	♦-9,77	±4,31
0 - 10	♦-8,30	±4,31
0 - 15	-3,85	±4,31
0 - 21	-3,27	±4,31
0 - 28	-2,02	±4,31
0 - 36	-1,13	±4,31
0 - 45	-0,06	±4,69
0 - 55	0,57	±4,69
1 - 3	-3,28	±4,06
3 - 6	♦-4,63	±4,31
6 - 10	1,47	±4,54
10 - 15	4,45	±4,54
15 - 21	0,58	±4,54
21 - 28	1,25	±4,54
28 - 36	0,89	±4,54
36 - 45	1,07	±4,90
45 - 55	0,63	±5,24

Tabla nº 17. Valores de HCM (pg) de los animales a lo largo del experimento, expresados como valor medio \pm desviación estándar. La tabla muestra el análisis de varianza entre tomas señalándose el nivel de significación estadística mediante asteriscos (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$).

Tabla nº 18. Test de la diferencia mínima significativa (LSD) para los valores de HCM, comparando todas las tomas con la toma inicial (día 0), y cada toma con su inmediata anterior; ♦ indica diferencias estadísticamente significativas entre ellas con $p < 0,05$.

CHCM		
Día	media	DS
0	30,60	1,66
1	40,82	6,60
3	43,70	15,60
6	32,72	2,90
10	30,60	0,40
15	29,23	1,48
21	29,23	1,06
28	30,44	1,30
36	29,95	1,25
45	29,35	1,73
55	28,70	1,30
$F_{(10,34)}$	3,37	
p	**(0,004)	

CHCM		
Contraste días	Diferencia	Límite
0 - 1	♦-10,22	±7,68
0 - 3	♦-13,10	±7,68
0 - 6	-2,21	±8,14
0 - 10	0,00	±8,14
0 - 15	1,37	±8,14
0 - 21	1,37	±8,14
0 - 28	0,16	±8,14
0 - 36	0,65	±8,14
0 - 45	1,25	±8,87
0 - 55	1,90	±8,87
1 - 3	-2,88	±7,68
3 - 6	♦10,98	±8,14
6 - 10	2,12	±8,58
10 - 15	1,37	±8,58
15 - 21	0,00	±8,58
21 - 28	-1,21	±8,58
28 - 36	0,49	±8,58
36 - 45	0,60	±9,27
45 - 55	0,65	±9,91

Tabla nº 19. Valores de CHCM (g/dl) de los animales a lo largo del experimento, expresados como valor medio \pm desviación estándar. La tabla muestra el análisis de varianza entre tomas señalándose el nivel de significación estadística mediante asteriscos (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$).

Tabla nº 20. Test de la diferencia mínima significativa (LSD) para los valores de CHCM, comparando todas las tomas con la toma inicial (día 0), y cada toma con su inmediata anterior; ♦ indica diferencias estadísticamente significativas entre ellas con $p < 0,05$.

LDH		
Día	media	DS
0	365,90	230,34
1	3511,20	588,78
3	953,50	523,63
6	1348,00	636,00
10	408,00	78,50
15	770,00	458,22
21	574,00	185,32
28	446,50	299,01
36	624,00	432,82
45	380,00	262,00
55	514,63	391,77
F _(10,34)	22,9	
p	*** (0,0003)	

LDH		
Contraste días	Diferencia	Límite
0 - 1	♦-3145,60	±537,03
0 - 3	♦-587,90	±537,03
0 - 6	♦-982,40	±569,60
0 - 10	-42,40	±569,60
0 - 15	-404,40	±569,60
0 - 21	-208,40	±569,60
0 - 28	-80,90	±569,60
0 - 36	-258,40	±569,60
0 - 45	-14,40	±620,10
0 - 55	-149,03	±620,10
1 - 3	♦-2557,7	±537,03
3 - 6	-394,50	±569,60
6 - 10	♦940,00	±600,41
10 - 15	-362,00	±600,41
15 - 21	196,00	±600,41
21 - 28	127,50	±600,41
28 - 36	-177,50	±600,41
36 - 45	244,00	±648,52
45 - 55	-134,63	±693,30

Tabla nº 21. Valores de LDH (U/l) de los animales a lo largo del experimento, expresados como valor medio \pm desviación estándar. La tabla muestra el análisis de varianza entre tomas señalándose el nivel de significación estadística mediante asteriscos (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$).

Tabla nº 22. Test de la diferencia mínima significativa (LSD) para los valores de LDH, comparando todas las tomas con la toma inicial (día 0), y cada toma con su inmediata anterior; ♦ indica diferencias estadísticamente significativas entre ellas con $p < 0,05$.

Bilirrubina Total		
Día	media	DS
0	0,60	0,19
1	3,64	1,91
3	3,84	3,88
6	1,32	0,32
10	0,76	0,19
15	0,75	0,33
21	0,89	0,21
28	0,70	0,25
36	0,89	0,45
45	0,74	0,45
55	0,86	0,37
F _(10,34)	2,96	
p	**(0,008)	

Bilirrubina Total		
Contraste días	Diferencia	Límite
0 - 1	♦-3,04	±1,94
0 - 3	♦-3,24	±1,94
0 - 6	-0,72	±2,06
0 - 10	-0,16	±2,06
0 - 15	-0,15	±2,06
0 - 21	-0,29	±2,06
0 - 28	-0,10	±2,06
0 - 36	-0,29	±2,06
0 - 45	-0,14	±2,24
0 - 55	-0,26	±2,24
1 - 3	-0,20	±1,94
3 - 6	♦2,52	±2,06
6 - 10	0,56	±2,17
10 - 15	0,01	±2,17
15 - 21	-0,14	±2,17
21 - 28	0,19	±2,17
28 - 36	-0,19	±2,17
36 - 45	0,15	±2,34
45 - 55	-0,12	±2,50

Tabla nº 23. Valores de BILT (mg/dl) de los animales a lo largo del experimento, expresados como valor medio \pm desviación estándar. La tabla muestra el análisis de varianza entre tomas señalándose el nivel de significación estadística mediante asteriscos (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$).

Tabla nº 24. Test de la diferencia mínima significativa (LSD) para los valores de BILT, comparando todas las tomas con la toma inicial (día 0), y cada toma con su inmediata anterior; ♦ indica diferencias estadísticamente significativas entre ellas con $p < 0,05$.

Hierro		
Día	media	DS
0	270,63	45,81
1	541,27	77,77
3	251,19	79,78
6	348,91	88,00
10	179,06	57,60
15	142,19	56,82
21	236,16	13,13
28	192,75	31,96
36	201,41	24,19
45	191,80	60,17
55	193,70	46,20
$F_{(10,34)}$	16,48	
p	*** (0,0003)	

Tabla nº 25. Valores de hierro ($\mu\text{g}/\text{dl}$) de los animales a lo largo del experimento, expresados como valor medio \pm desviación estándar. La tabla muestra el análisis de varianza entre tomas señalándose el nivel de significación estadística mediante asteriscos (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$).

Hierro		
Contraste días	Diferencia	Límite
0 - 1	♦-270,63	$\pm 75,64$
0 - 3	19,44	$\pm 75,64$
0 - 6	-78,27	$\pm 80,22$
0 - 10	♦91,57	$\pm 80,22$
0 - 15	♦128,45	$\pm 80,22$
0 - 21	34,47	$\pm 80,22$
0 - 28	77,88	$\pm 80,22$
0 - 36	69,22	$\pm 80,22$
0 - 45	78,83	$\pm 87,32$
0 - 55	76,93	$\pm 87,32$
1 - 3	♦290,08	$\pm 75,64$
3 - 6	♦-97,72	$\pm 80,22$
6 - 10	♦169,84	$\pm 84,58$
10 - 15	36,87	$\pm 84,58$
15 - 21	♦-93,97	$\pm 84,58$
21 - 28	43,41	$\pm 84,58$
28 - 36	-8,66	$\pm 84,587$
36 - 45	9,61	$\pm 91,34$
45 - 55	-1,90	$\pm 97,66$

Tabla nº 26. Test de la diferencia mínima significativa (LSD) para los valores de hierro, comparando todas las tomas con la toma inicial (día 0), y cada toma con su inmediata anterior; ♦ indica diferencias estadísticamente significativas entre ellas con $p < 0,05$.

ALAT		
Día	media	DS
0	97,24	49,56
1	397,76	86,88
3	331,12	71,60
6	229,85	56,99
10	78,00	17,43
15	79,95	17,34
21	75,27	16,62
28	75,30	32,60
36	82,20	37,91
45	84,00	4,40
55	85,90	12,10
Chi ²	29,81	
p	*** (0,0009)	

ALAT		
Contraste	Z (contraste de hipótesis)	p (por los dos lados)
0 - 1	-2,51	0,01 ♦
0 - 3	-2,51	0,01 ♦
0 - 6	2,08	0,04 ♦
0 - 10	-0,12	0,90
0 - 15	-0,37	0,71
0 - 21	-0,13	0,90
0 - 28	-0,61	0,54
0 - 36	0,00	1,00
0 - 45	0,30	0,77
0 - 55	0,30	0,77
1 - 3	1,04	0,30
3 - 6	-1,84	0,07
6 - 10	2,16	0,03 ♦
10 - 15	-0,14	0,89
15 - 21	0,14	0,89
21 - 28	0,43	0,67
28 - 36	-0,72	0,47
36 - 45	0,53	0,60
45 - 55	0,18	0,86

Tabla nº 27. Valores de ALAT (U/l) de los animales a lo largo del experimento, expresados como valor medio \pm desviación estándar. La tabla muestra el test de comparaciones múltiples de Kruskal-Wallis entre tomas señalándose el nivel de significación estadística mediante asteriscos (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$).

Tabla nº 28. Test de Mann-Whitney para los valores de ALAT, comparando todas las tomas con la toma inicial (día 0), y cada toma con su inmediata anterior; ♦ indica diferencias estadísticamente significativas entre ellas con $p < 0,05$.

ASAT		
Día	media	DS
0	199,48	63,50
1	564,88	126,67
3	548,36	245,78
6	556,70	181,56
10	188,93	26,80
15	245,50	72,92
21	197,45	41,55
28	199,85	53,31
36	253,13	115,05
45	247,60	78,40
55	251,90	30,30
Chi ²	28,50	
p	** (0,0015)	

ASAT		
Contraste	Z (contraste de hipótesis)	p (por los dos lados)
0 - 1	-2,51	0,01 ♦
0 - 3	-2,30	0,02 ♦
0 - 6	2,33	0,02 ♦
0 - 10	0,00	1,00
0 - 15	1,10	0,27
0 - 21	0,36	0,71
0 - 28	0,12	0,90
0 - 36	0,61	0,64
0 - 45	1,19	0,23
0 - 55	0,89	0,37
1 - 3	0,21	0,83
3 - 6	0,00	1,00
6 - 10	2,17	0,03 ♦
10 - 15	-1,01	0,31
15 - 21	1,01	0,31
21 - 28	0,00	1,00
28 - 36	-0,43	0,67
36 - 45	0,00	1,00
45 - 55	0,00	1,00

Tabla nº 29. Valores de ASAT (U/l) de los animales a lo largo del experimento, expresados como valor medio \pm desviación estándar. La tabla muestra el test de comparaciones múltiples de Kruskal-Wallis entre tomas señalándose el nivel de significación estadística mediante asteriscos (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$).

Tabla nº 30. Test de Mann-Whitney para los valores de ASAT, comparando todas las tomas con la toma inicial (día 0), y cada toma con su inmediata anterior; ♦ indica diferencias estadísticamente significativas entre ellas con $p < 0,05$.

Fosfatasa alcalina		
Día	media	DS
0	89,44	11,73
1	77,28	5,07
3	50,32	12,02
6	42,50	10,35
10	55,90	13,13
15	73,00	3,24
21	72,40	6,08
28	70,60	14,28
36	76,40	7,85
45	88,07	3,21
55	72,80	7,83
$F_{(10,34)}$	9,85	
p	*** (0,0002)	

Fosfatasa alcalina		
Contraste días	Diferencia	Límite
0 - 1	12,16	±12,38
0 - 3	♦39,12	±12,38
0 - 6	♦46,94	±13,13
0 - 10	♦33,54	±13,1
0 - 15	♦16,44	±13,13
0 - 21	♦17,04	±13,13
0 - 28	♦18,84	±13,13
0 - 36	13,04	±13,13
0 - 45	1,37	±14,29
0 - 55	♦16,64	±14,29
1 - 3	♦26,96	±12,38
3 - 6	7,82	±13,13
6 - 10	-13,40	±13,84
10 - 15	♦-17,1	±13,84
15 - 21	0,60	±13,84
21 - 28	1,80	±13,8
28 - 36	-5,80	±13,84
36 - 45	-11,67	±14,95
45 - 55	15,27	±15,98

Tabla nº 31. Valores de FA (U/l) de los animales a lo largo del experimento, expresados como valor medio \pm desviación estándar. La tabla muestra el análisis de varianza entre tomas señalándose el nivel de significación estadística mediante asteriscos (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$).

Tabla nº 32. Test de la diferencia mínima significativa (LSD) para los valores de FA, comparando todas las tomas con la toma inicial (día 0), y cada toma con su inmediata anterior; ♦ indica diferencias estadísticamente significativas entre ellas con $p < 0,05$.

Urea		
Día	media	DS
0	40,56	8,95
1	28,00	4,69
3	47,04	11,39
6	36,15	5,05
10	37,20	6,59
15	40,80	4,20
21	46,60	11,34
28	46,95	15,77
36	41,80	3,51
45	36,27	0,46
55	42,20	7,98
$F_{(10,34)}$	2,05	
p	0,06	

Tabla nº 33. Valores de urea (mg/dl) de los animales a lo largo del experimento, expresados como valor medio \pm desviación estándar. La tabla muestra el análisis de varianza entre tomas señalándose el nivel de significación estadística mediante asteriscos (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$).

Creatinina (unidades)		
Día	media	DS
0	0,41	0,03
1	0,59	0,04
3	0,52	0,10
6	0,47	0,03
10	0,39	0,01
15	0,44	0,04
21	0,37	0,05
28	0,40	0,07
36	0,40	0,02
45	0,40	0,02
55	0,41	0,04
Chi ²	26,16	
p	** (0,004)	

Creatinina			
Contraste	Z (contraste de hipótesis)	p (por los dos lados)	
0 - 1	-2,77	0,01	♦
0 - 3	-1,80	0,07	
0 - 6	2,08	0,04	♦
0 - 10	0,00	1,00	
0 - 15	1,52	0,13	
0 - 21	-0,89	0,40	
0 - 28	0,0	1,00	
0 - 36	0,00	1,00	
0 - 45	0,00	1,00	
0 - 55	1,03	0,30	
1 - 3	1,30	0,19	
3 - 6	-0,26	0,79	
6 - 10	1,87	0,06	
10 - 15	-1,33	0,18	
15 - 21	1,50	0,13	
21 - 28	-0,33	0,74	
28 - 36	0,00	1,00	
36 - 45	0,00	1,00	
45 - 55	-0,70	0,50	

Tabla nº 34. Valores de creatinina (mg/dl) de los animales a lo largo del experimento, expresados como valor medio \pm desviación estándar. La tabla muestra el test de comparaciones múltiples de Kruskal-Wallis entre tomas señalándose el nivel de significación estadística mediante asteriscos (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$).

Tabla nº 35. Test de la diferencia mínima significativa (LSD) para los valores de creatinina, comparando todas las tomas con la toma inicial (día 0), y cada toma con su inmediata anterior; ♦ indica diferencias estadísticamente significativas entre ellas con $p < 0,05$

Proteína Total		
Día	media	DS
0	4,92	0,31
1	5,18	1,11
3	4,72	0,49
6	5,06	0,38
10	4,70	0,29
15	4,81	0,27
21	4,47	0,65
28	4,49	0,65
36	4,86	0,28
45	4,98	0,24
55	5,24	0,47
Chi ²	7,20	
p	0,71	

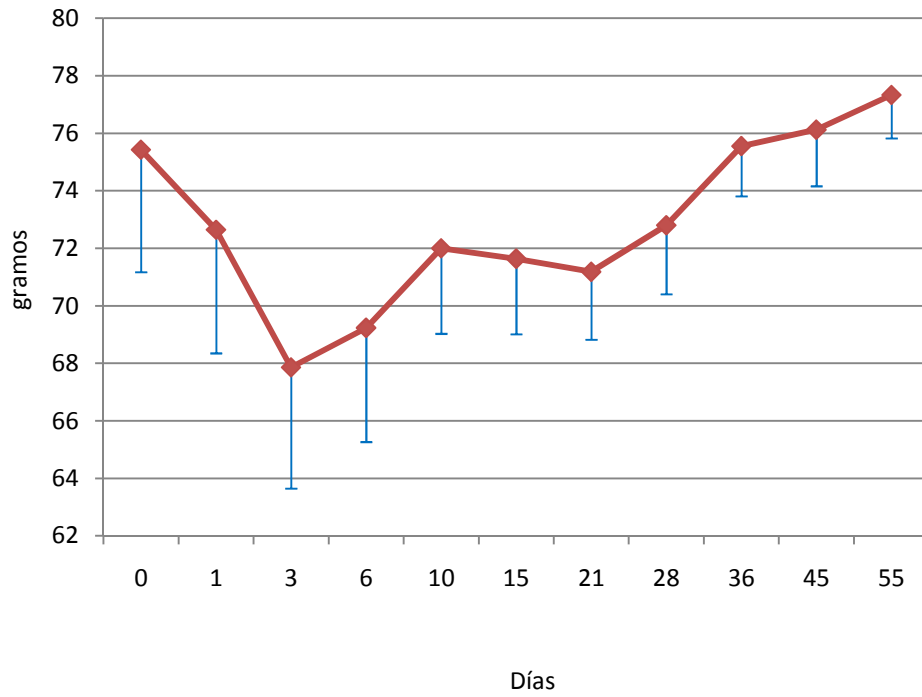
Tabla nº 36. Valores de proteína total (g/dl) de los animales a lo largo del experimento, expresados como valor medio \pm desviación estándar. La tabla muestra el test de comparaciones múltiples de Kruskal-Wallis entre tomas señalándose el nivel de significación estadística mediante asteriscos (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$).

Albúmina		
Día	media	DS
0	2,16	0,21
1	2,22	0,34
3	2,08	0,23
6	2,06	0,44
10	1,67	0,23
15	2,00	0,41
21	1,85	0,48
28	2,01	0,51
36	2,15	0,24
45	2,11	0,04
55	2,51	0,34
F _(10,34)	1,44	
p	0,20	

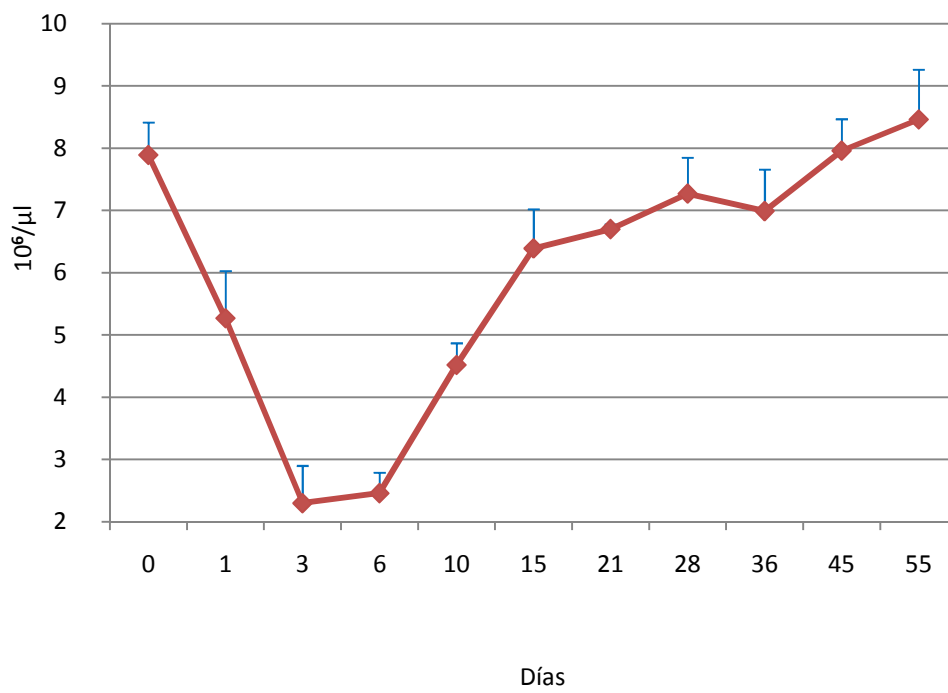
Tabla nº 37. Valores de albúmina (g/dl) de los animales a lo largo del experimento, expresados como valor medio \pm desviación estándar. La tabla muestra el análisis de varianza entre tomas señalándose el nivel de significación estadístico mediante asteriscos (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$).

GRÁFICAS

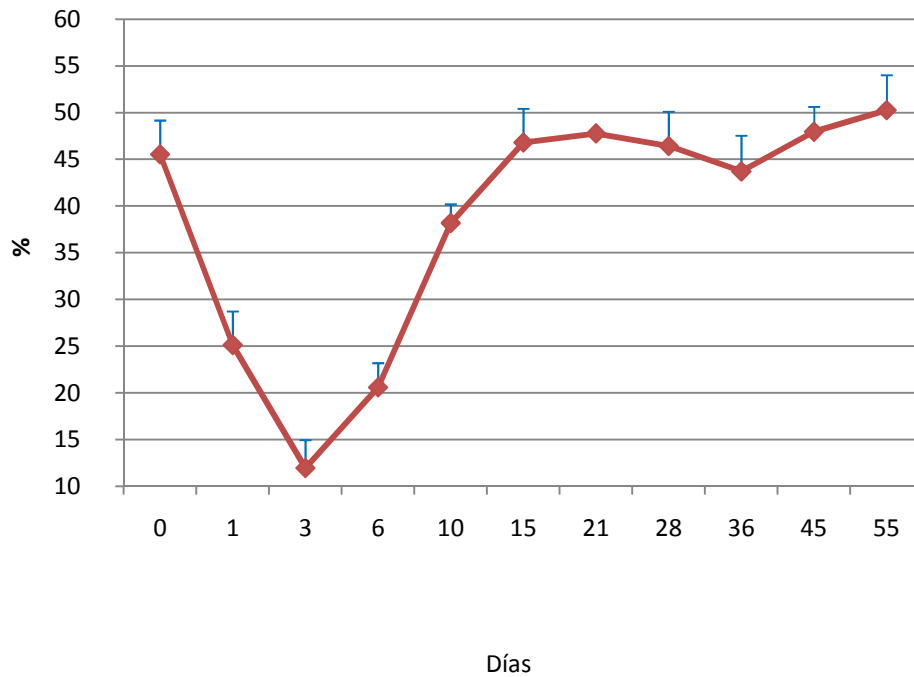
1. Peso



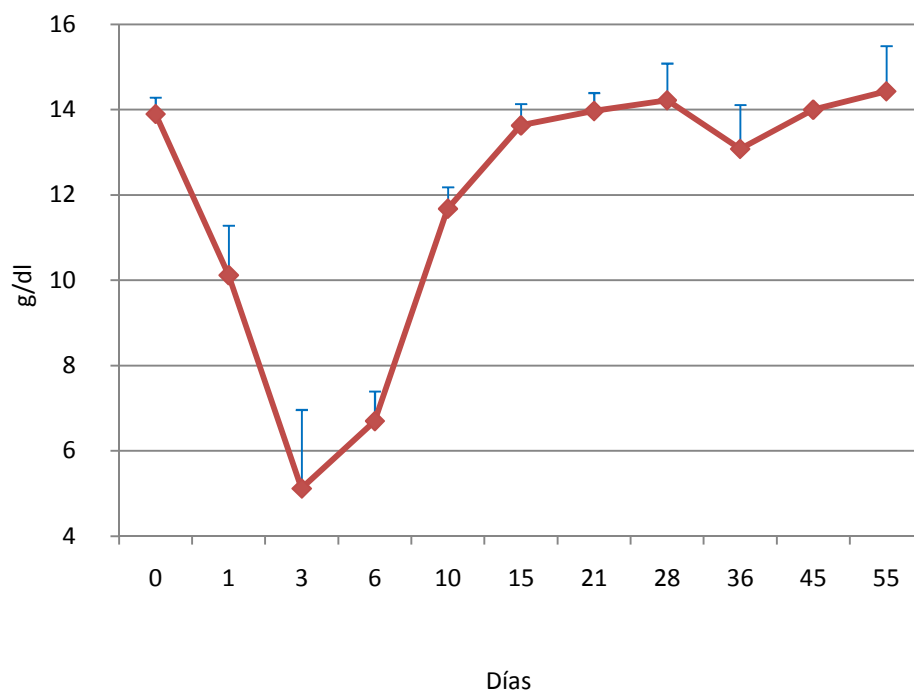
2. Glóbulos Rojos



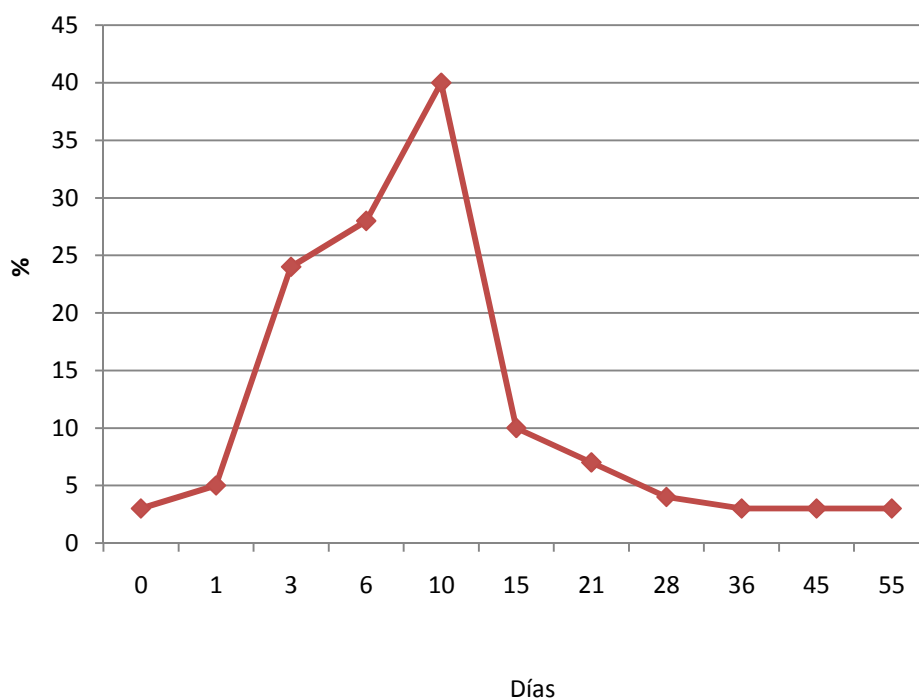
3. Hematocrito



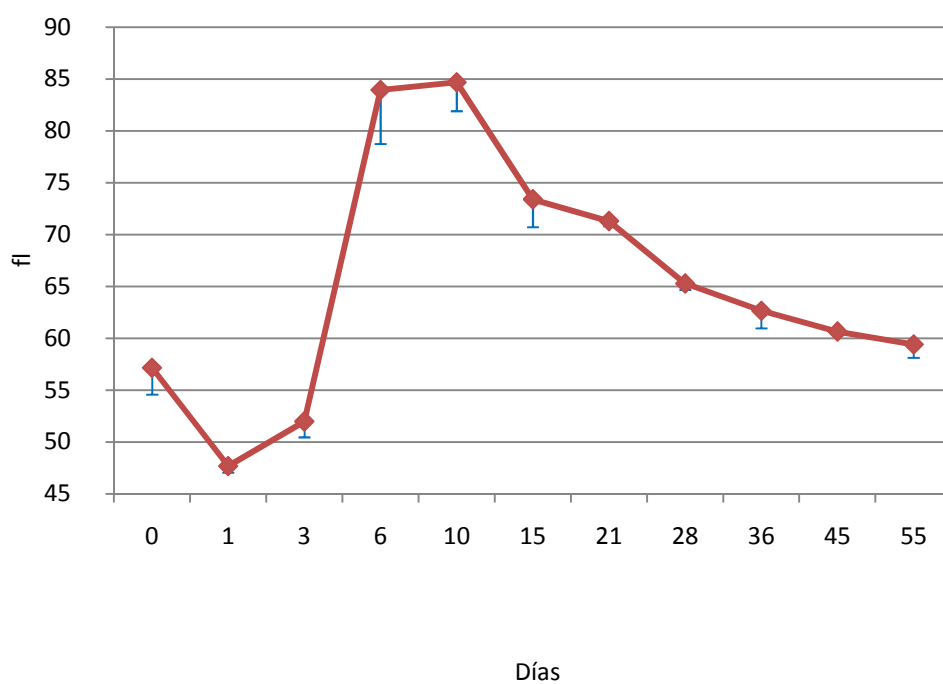
4. Hemoglobina



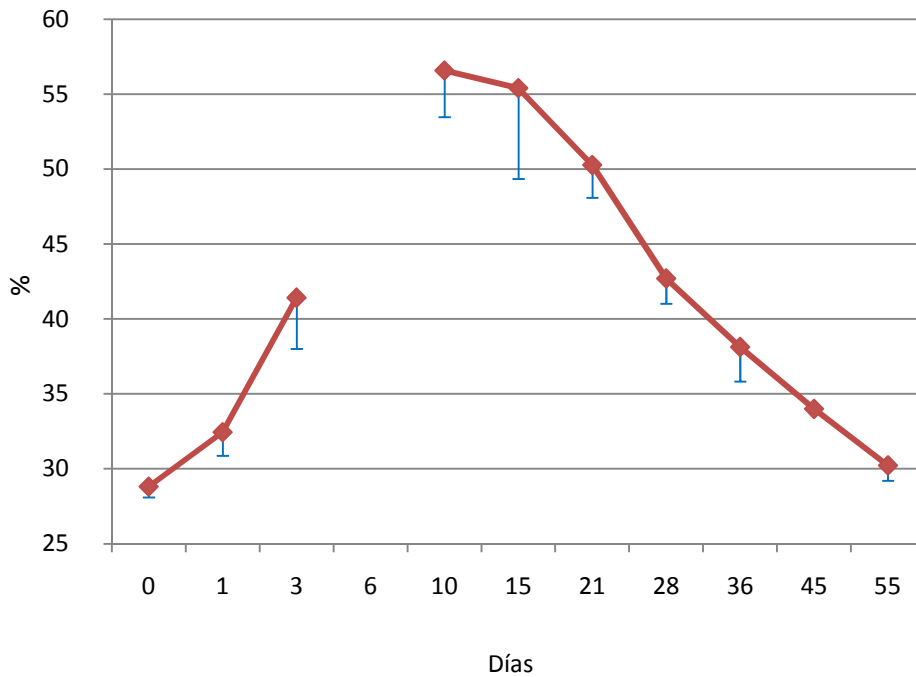
5. Reticulocitos



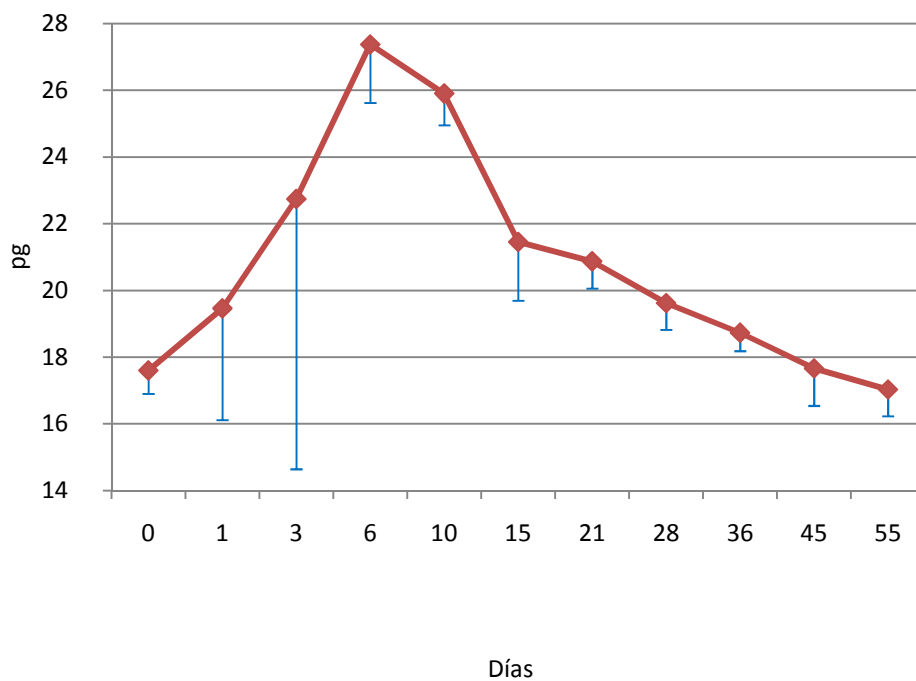
6. Volumen Corpuscular Medio



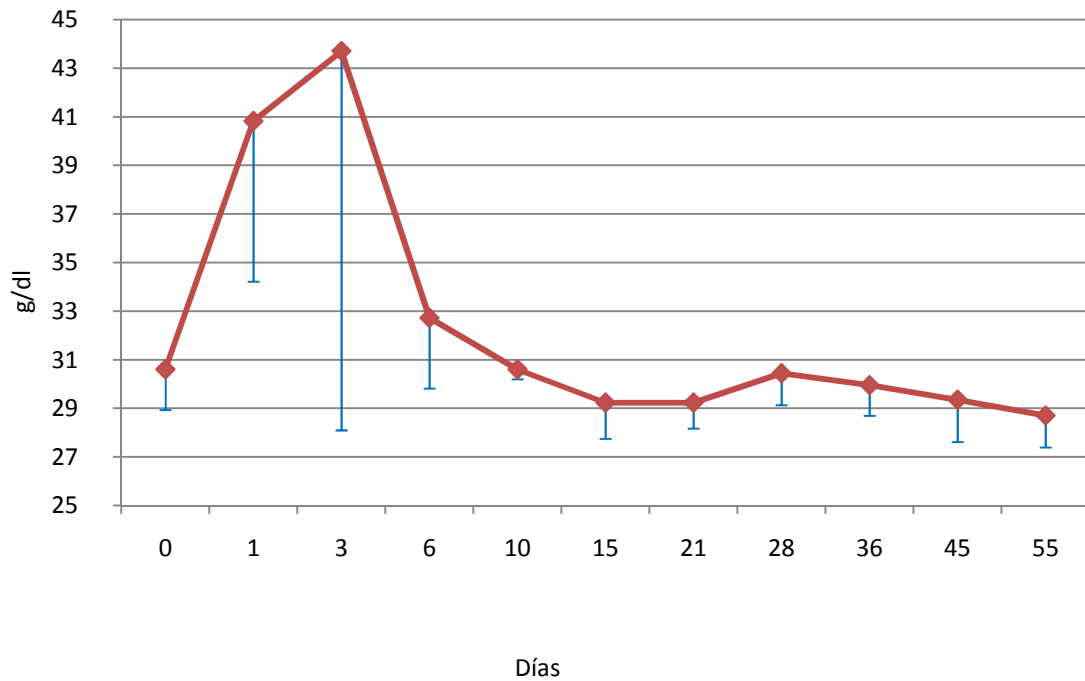
7. Ancho de Distribución de los Glóbulos Rojos



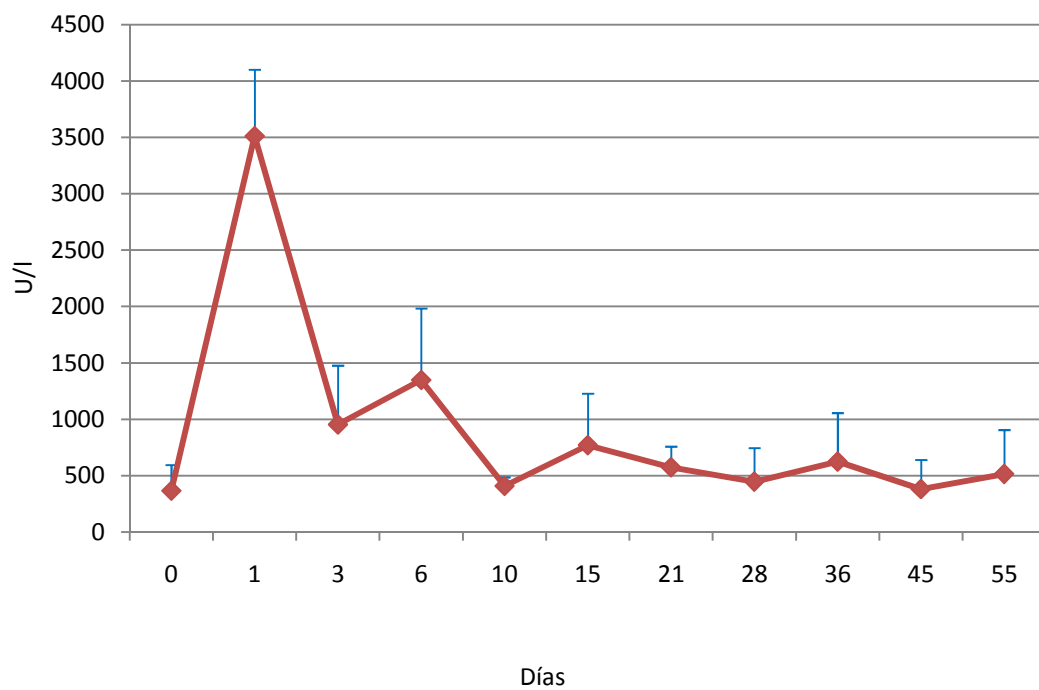
8. Hemoglobina Corpuscular Media



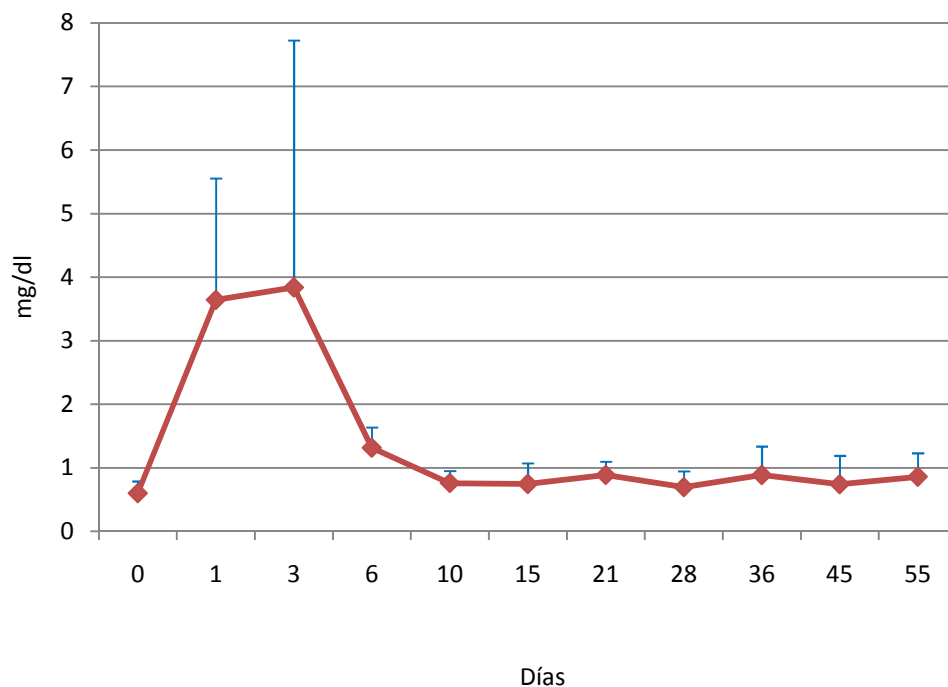
9. Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media



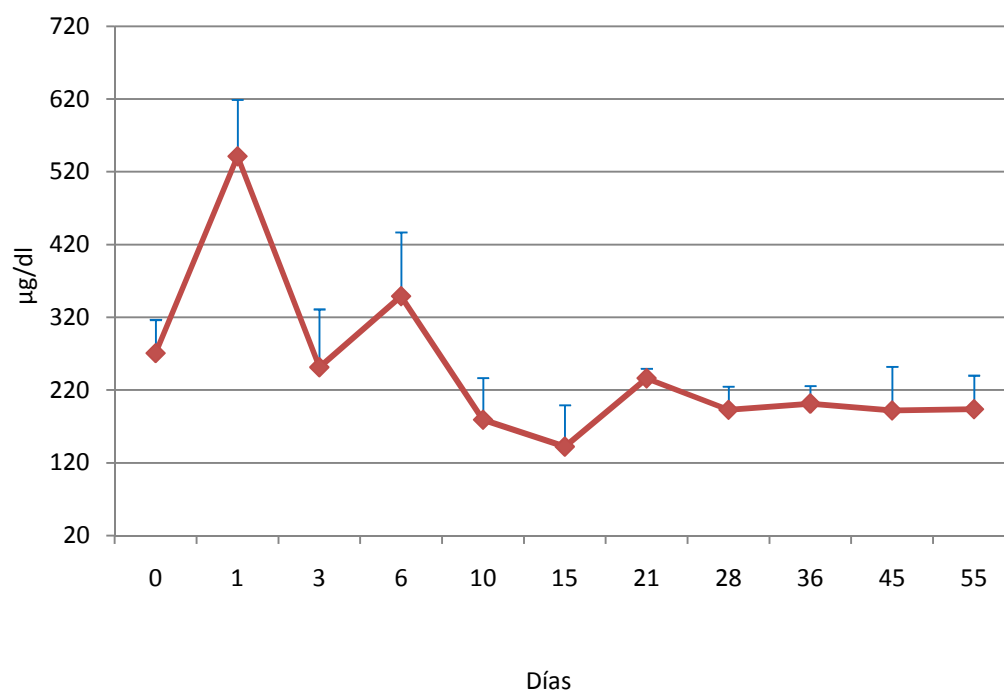
10. Lactato Deshidrogenasa



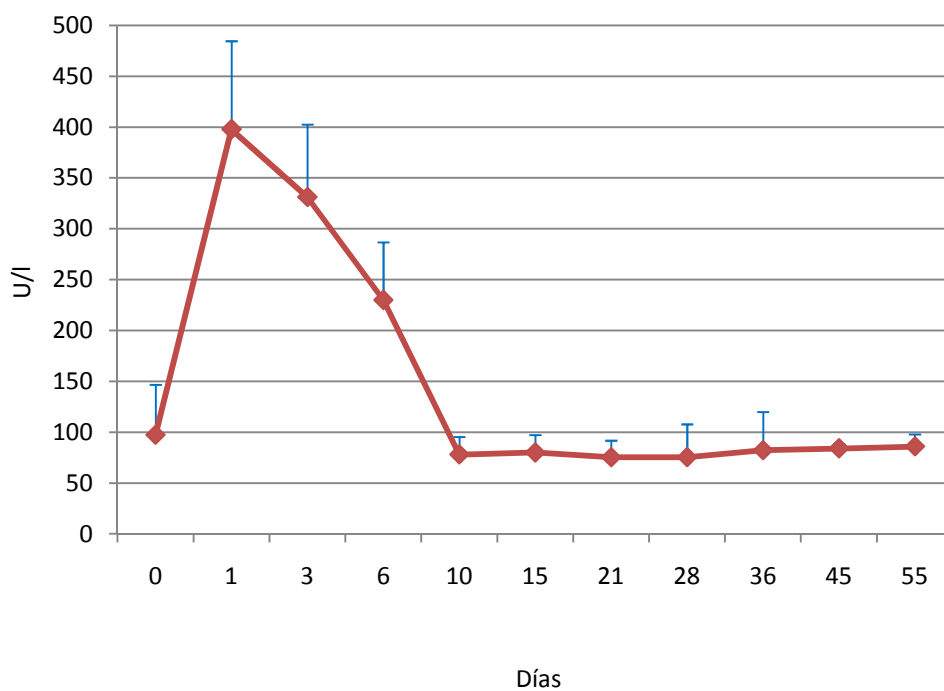
11. Bilirrubina Total



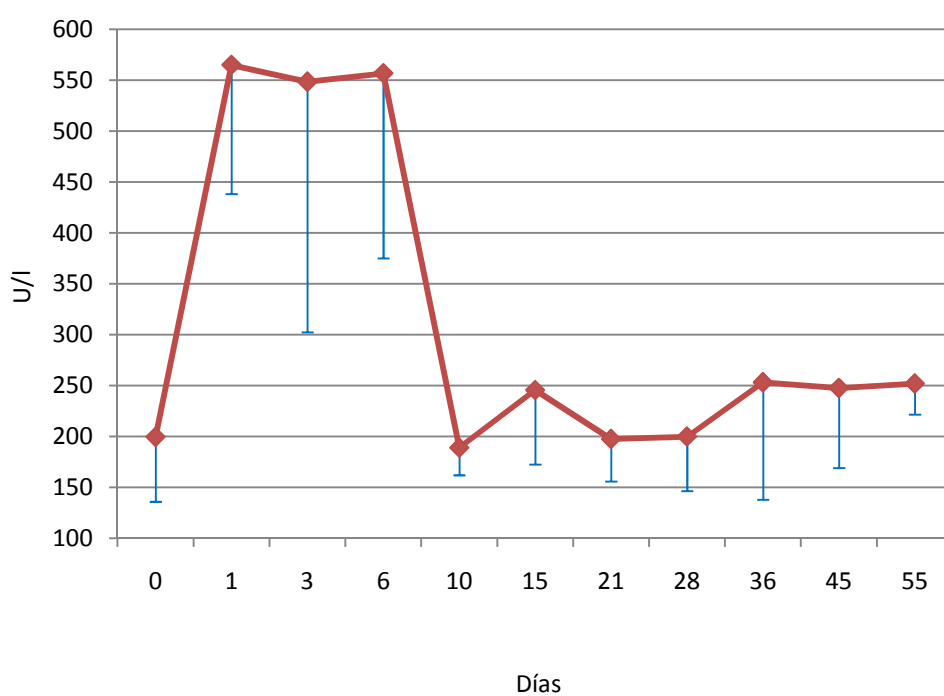
12. Hierro



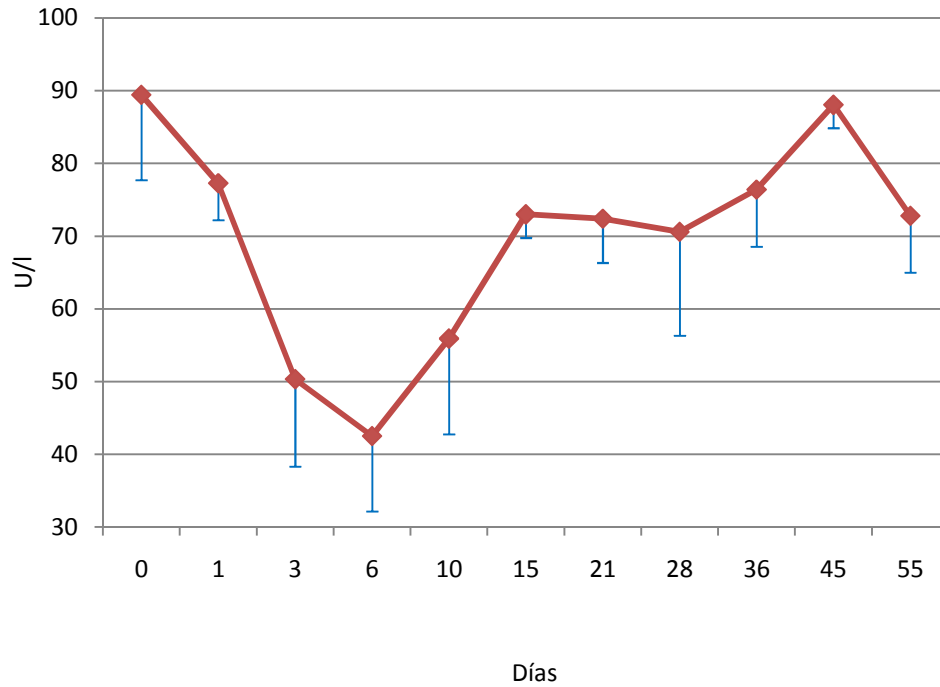
13. Alanina Aminotransferasa



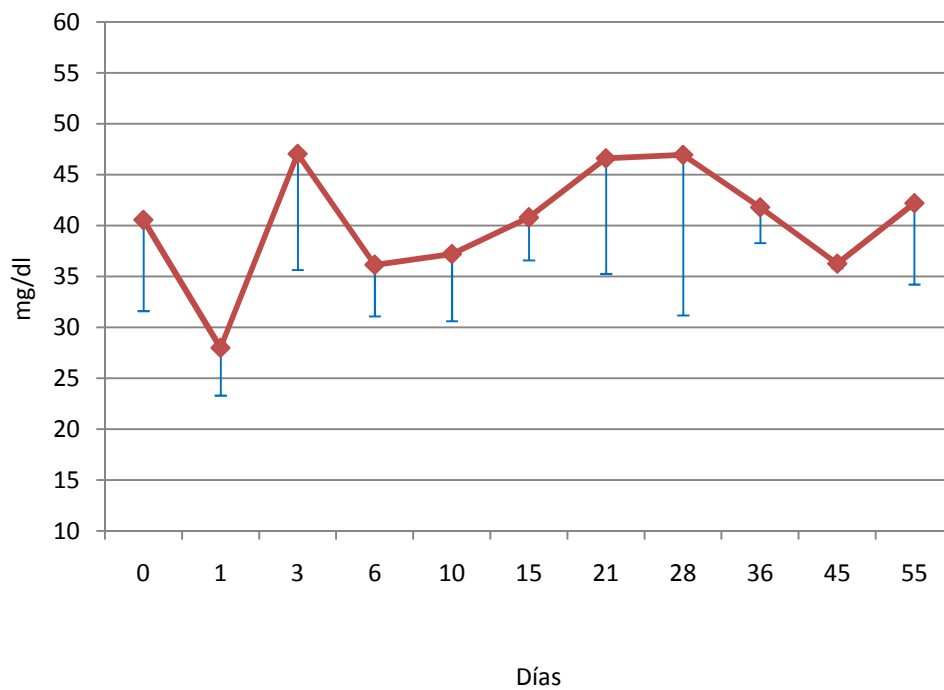
14. Aspartato Aminotransferasa



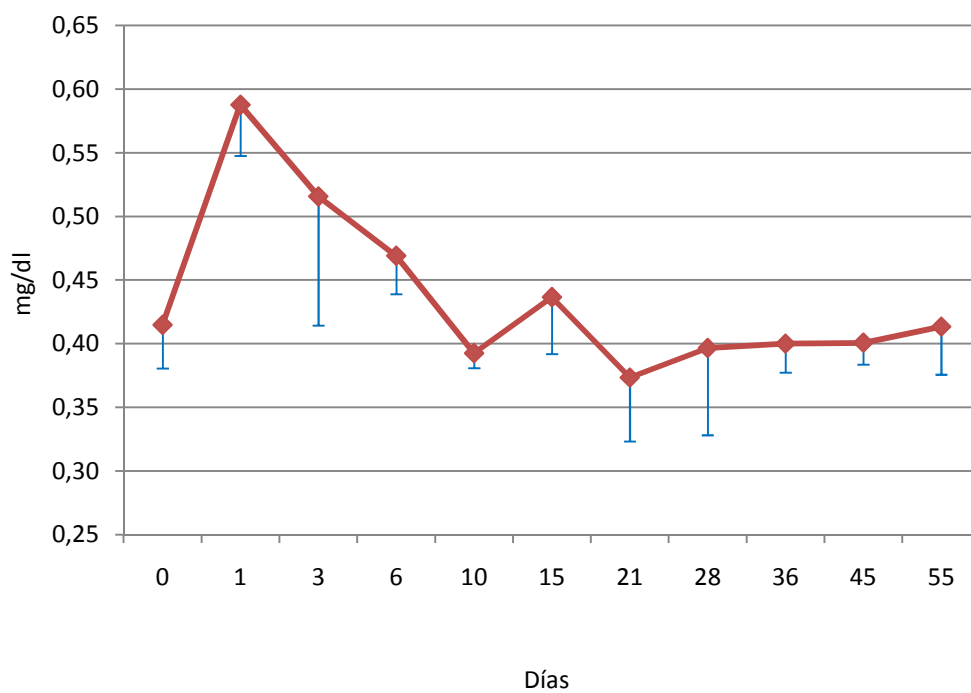
15. Fosfatasa Alcalina



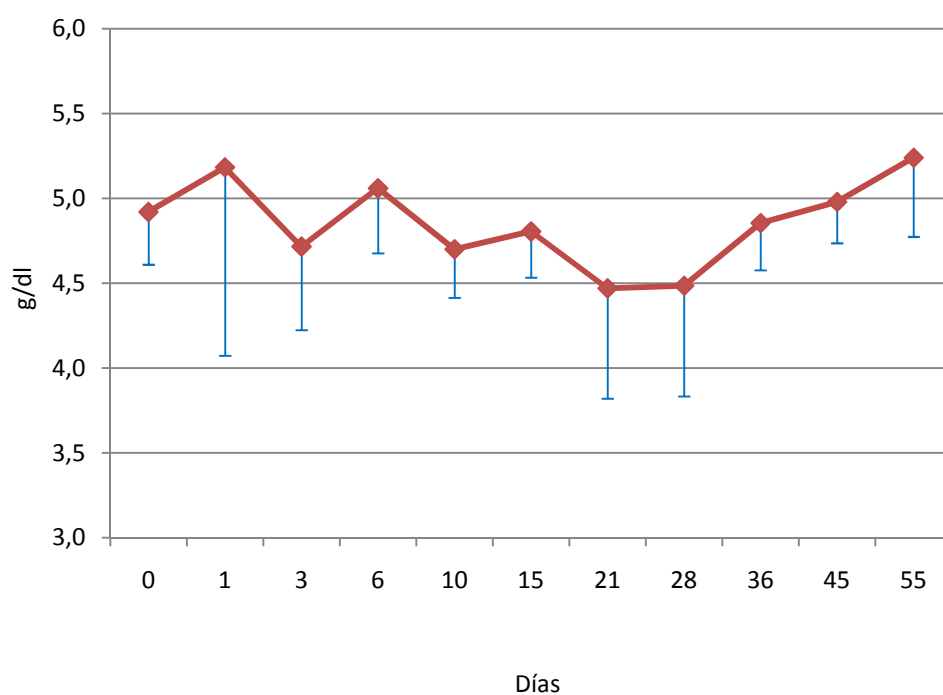
16. Urea



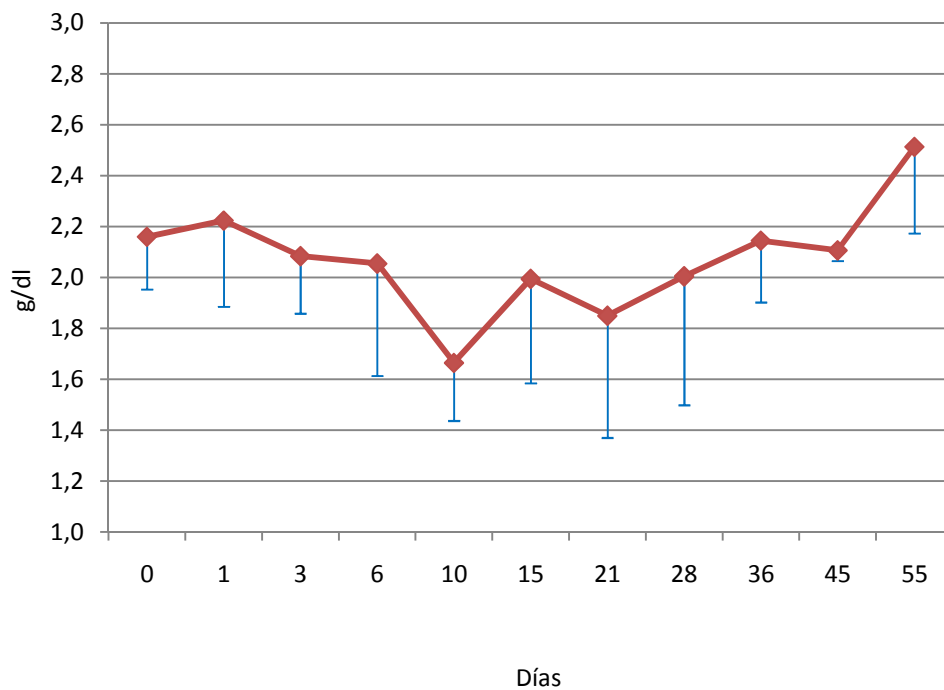
17. Creatinina



18. Proteína Total



19.-Albúmina



Imágenes



Imagen 1. Extracción sanguínea del plexo supraorbitario (I).



Imagen 2. Extracción sanguínea del plexo supraorbitario (II).



Imagen 3. Orina de color marrón provocada por la hemoglobinuria.



Imagen 4. Gota de sangre de color marrón debido a la metahemoglobinemia.



Imagen 5. Periné manchado de orina de color marrón por la hemoglobinuria.

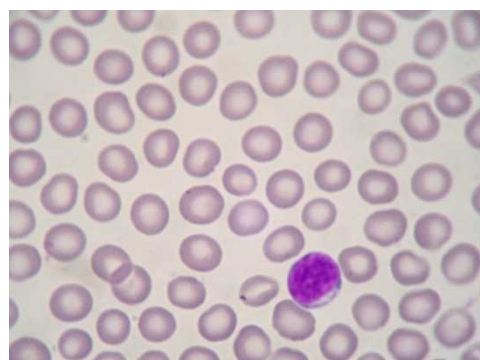


Imagen 6. Extensión sanguínea del día 0, Diff Quick® (Objetivo 100x).

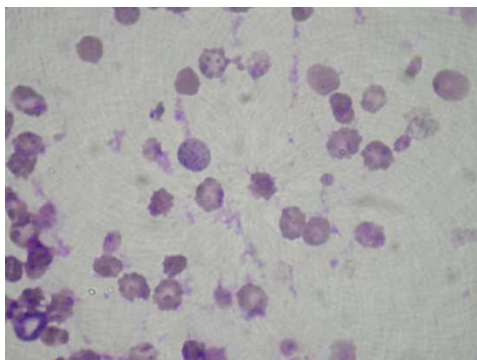


Imagen 7. Extensión sanguínea del día 1, Diff Quick® (Objetivo 100x).

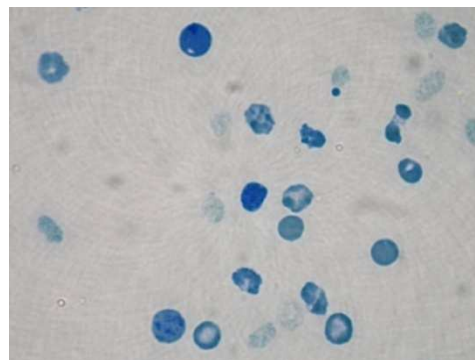


Imagen 8. Extensión sanguínea del día 1, NAM (Objetivo 100x).

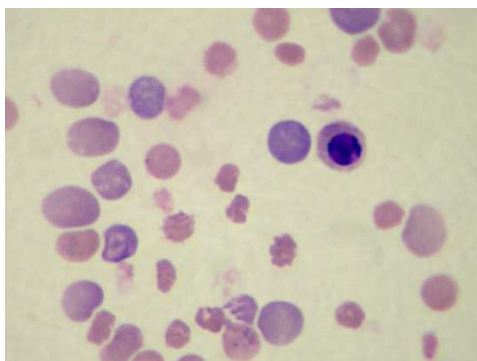


Imagen 9. Extensión sanguínea del día 3, Diff Quick® (Objetivo 100x).

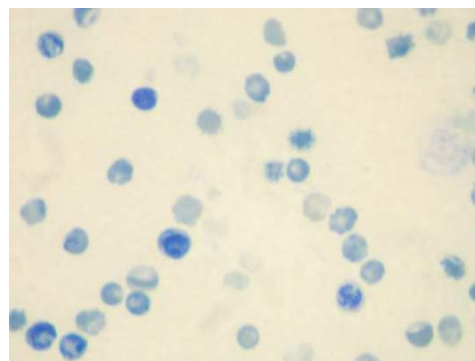


Imagen 10. Extensión sanguínea del día 3, NAM (Objetivo 100x).

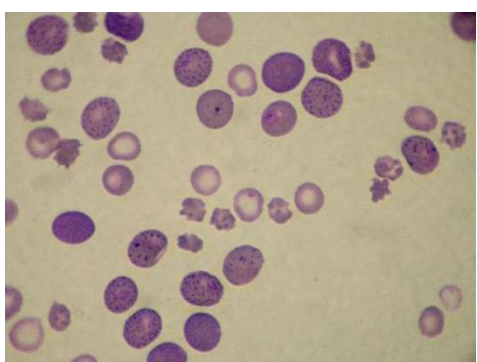


Imagen 11. Extensión sanguínea del día 6, Diff Quick® (Objetivo 100x).

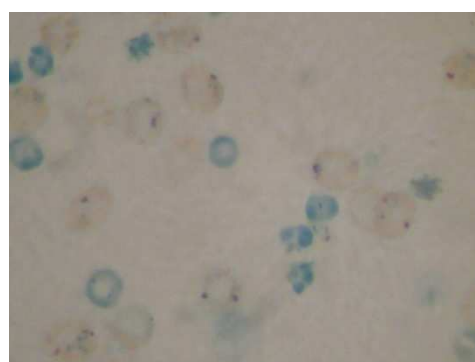


Imagen 12. Extensión sanguínea del día 6, NAM (Objetivo 100x).

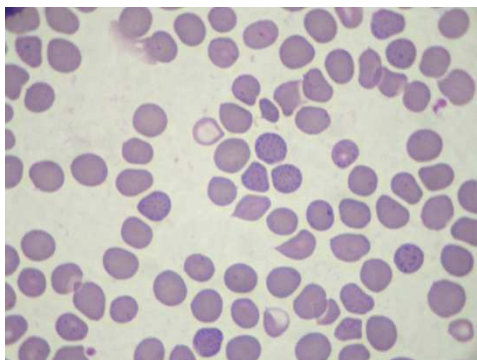


Imagen 13. Extensión sanguínea del día 10, Diff Quick® (Objetivo 100x).

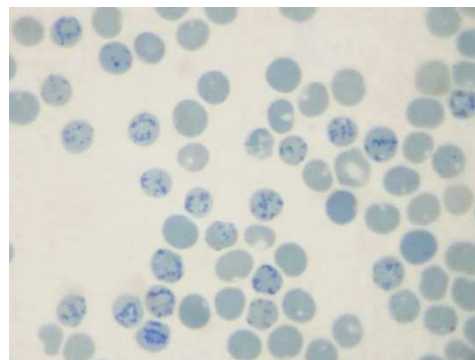


Imagen 14. Extensión sanguínea del día 10, NAM (Objetivo 100x).

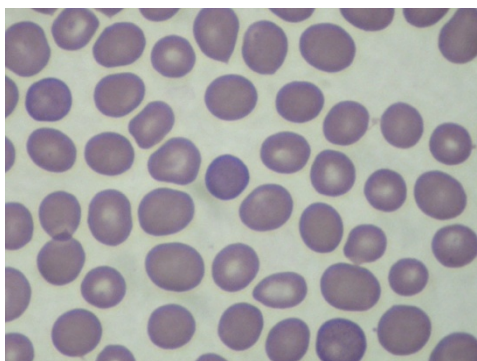


Imagen 15. Extensión sanguínea del día 15, Diff Quick® (Objetivo 100x).

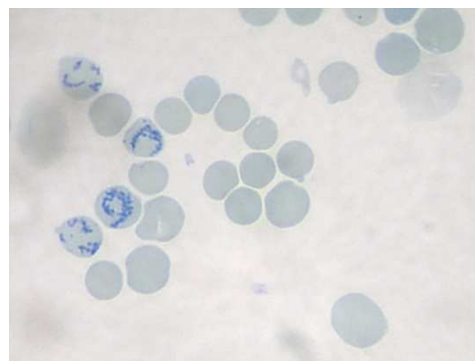


Imagen 16. Extensión sanguínea del día 15, NAM (Objetivo 100x).

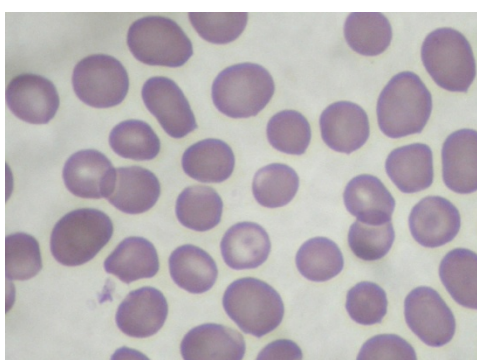


Imagen 17. Extensión sanguínea del día 15, Diff Quick® (Objetivo 100x).

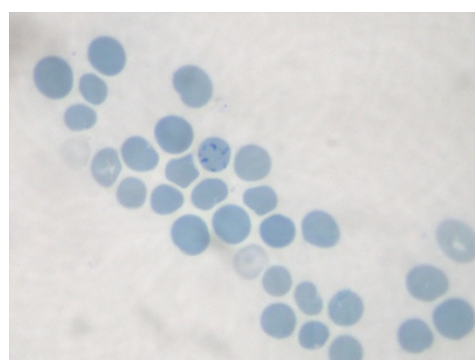


Imagen 18. Extensión sanguínea del día 15, NAM (Objetivo 100x).

Discusión

1. ELECCIÓN DEL MODELO EXPERIMENTAL

La mayoría de los modelos experimentales de anemia por oxidación han sido llevados a cabo en el ratón y la rata. Nosotros hemos escogido el jerbo de Mongolia (*Meriones unguiculatus*) para la elaboración de este modelo, ya que presenta ventajas generales respecto al mantenimiento y manejo, así como específicas dada su alta capacidad de regeneración de los glóbulos rojos ya que los tiempos medios de supervivencia determinados con el Cr⁵¹ son de 9,9 días (Womack, 1972), 8-13,7 días (Dillon y Glomski, 1975) y 9,4-10,5 días (Rosa y Glomski, 1981).

En cuanto al manejo cabe destacar su fácil manipulación (Williams, 1974), menor coste de alimentación que la rata así como la necesidad de menos espacio para su alojamiento (Cheal, 1986). No es preciso cambiar la cama con tanta frecuencia como el resto de roedores ya que por su naturaleza desértica elimina pequeñas cantidades de orina (Loew, 1984).

Se considera una especie homogénea genéticamente de manera que los resultados obtenidos en los experimentos suelen ser más significativos que en otras especies con una menor homogeneidad genética. La repetibilidad de los resultados de un experimento utilizando la misma cepa de jerbo es muy alta (Robinson, 1975).

Es necesario señalar que la utilización del jerbo supone una serie de inconvenientes, entre los que se encuentra el desconocimiento de muchos parámetros fisiológicos no estudiados todavía en profundidad, y conlleva la dificultad en la discusión de ciertos parámetros y que, por lo tanto es necesario utilizar nuestros resultados como de referencia para estudios posteriores. Entre los libros que sí citan parámetros sanguíneos se encuentran Harkness y Wagner (1995), Laber-Laird (1996), Field y Sibold (1999) que en su mayor parte proceden de un antiguo estudio de Mays en 1969.

También es de destacar la experiencia del equipo de trabajo de esta universidad con el manejo de este animal, fruto de la realización de diversos trabajos (Cano et al., 1995; Cano et al., 1999-2000; de la Puente-Redondo et al., 1999; Diez-Prieto et al., 2000; Cano et al., 2001; Diez-Prieto et al., 2002; Peña Penabad et al., 2002; Pilar-Cuellar et al., 2005), así como de la realización de 3 tesis doctorales

anteriores (Peña Penabad, 2002; Gallego Morales, 2002 y Miguélez de la Puente, 2007).

2. ELECCIÓN DEL OXIDANTE

La PHZ se utiliza para la inducción de anemia hemolítica y el estudio de su mecanismo de acción en multitud de especies: conejo (Hoppe-Seyler, 1985; Brugnara y Defranceschi, 1993; Nakanishi et al., 2003; Xie et al., 2003), rata (Yeshoda, 1942; Berger, 1985), ratón (Golab et al., 2002; Paul et al., 1999), perro (Brock et al., 1989), ternera (Sharma et al., 1991), pollo (Datta et al., 1990), pato (Rigdon, 1953), trucha arco iris (Gilmour y Perry, 1996; McClelland et al., 2005) y rana (Twersky et al., 1995).

3. ELECCIÓN DE LA VÍA DE ADMINISTRACIÓN Y LA DOSIS

Para inducir la anemia hemolítica se utilizó una única dosis de 60 mg/kg de clorhidrato de PHZ (Sigma®) por vía intraperitoneal en jerbos de 6-7 meses, una vez consultada la bibliografía existente:

Dosis (mg/kg)	Especie	Vía	Sexo	Edad	Peso	Autor	Año
40	Perro	IV			5,5-11 kg	Muirhead et al.	1954
50	Perro	IV				Harley y Mauer	1960
8 (durante 2 d)	Conejo	IM			2-3 kg	Sheeler y Barber	1965
50 (cada 2 d durante 6 d)	Rata	IP	M		300-490 g	Flanagan y Lessler	1970
60 (cada 2 d durante 14 d)	Rata	SC	M		295-305 g	Ades y Cascarano	1979
12	Conejo	SC			2,5-3 kg	Benestad e Iversen	1983

100	Rata	SC	M		180-200 g	Maines y Veltman	1984
90	Rata	IP	M	2 m		Berger	1985
20	Conejo	IP			4 kg	McMullin et al.	1989
40 (más 20 cada 7 d durante 42 d)	Rata	IP	M		165-235 g	Naughton et al.	1989
40	Rata	SC			150-200 g	Dornfest et al.	1990
60	Ternero	IV				Sharma et al.	1991
50	Rata	IP			380-420 g	Iversen et al.	1992
12,5 (durante 21 d)	Rata	IP	M	3 m	325 g	Redondo et al.	1995
50	Rata	SC	M	7 sem		Naeshiro et al.	1998
25 (cada 2 d, durante 10 sem)	Ratón	IP		2 m		Paul et al.	1999
50 (durante 3 d)	Rata	IP	M	40 d	125-150 g	Criswell et al.	2000
12,5 (durante 8 d)	Rata	IP	M		300-400 g	Pesquero et al.	2000
60 (durante 2 d)	Ratón	IP				Vannuncchi et al.	2001
50	Rata	IP				Burkhard et al.	2001
150	Ratón	IP				Ajioka et al.	2002
40	Rata	IM	M		225-275 g	Conrad et al.	2005
125	Rata	IP	M		230-250 g	Luangaram et al.	2006
60	Ratón	IP		7-8 sem		Cromer et al.	2006

20 (durante 4 d)	Rata	IP	H	4 sem		Rokushima et al.	2007
80	Rata	IP	H	4 sem		Rokushima et al.	2007
40	Rata	IP	M y H		150-200 g	Diallo et al.	2008
75	Rata	IP		15 d		Rice y Shapiro	2008
75 (durante 2 d)	Rata	IP		7 d		Mejía et al.	2008
80	Ratón	IP		42-56 d		Zivni et al.	2008
60 (durante 2 d)	Ratón	IP		10 sem		Goossens et al.	2009
100	Ratón	IP				Lenox et al.	2009

Abreviaturas: d = día, sem = semana, m = mes, H = hembra, M = macho

Observamos que la especie más estudiada es la rata seguida del ratón, en las cuales actualmente se sigue utilizando la PHZ para provocar anemia. Por otra parte, la vía más utilizada es la intraperitoneal.

4. ELECCIÓN DE LOS PARÁMETROS A INVESTIGAR

Ante una anemia hemolítica los parámetros más relevantes a estudiar son el número de eritrocitos, hemoglobina, hematocrito, índices eritrocitarios (VCM, HCM y CHCM), RDW, LDH, bilirrubina y hierro (Meyer y Harvey, 2004).

El diagnóstico de hemólisis se establece mediante la constatación del aumento de reticulocitos, la bilirrubina, la LDH y el descenso de la haptoglobina (Dhaliwal et al., 2004).

Berger (1985) constata que el descenso del número de eritrocitos, del hematocrito y de los niveles de hemoglobina, el aumento del número de reticulocitos, la aparición de cuerpos de Heinz, el incremento del VCM y de la HCM y el descenso de la fragilidad osmótica de los eritrocitos son especialmente significativos en el diagnóstico de la anemia hemolítica en ratas.

Aún siendo interesante la determinación de algún otro parámetro hay que considerar la limitación de la cantidad de sangre que se puede extraer. No debe ser más de un 10-15% del volumen total de sangre para evitar un shock hipovolémico (Morton et al., 1993). Si tenemos en cuenta que el jerbo posee, aproximadamente, 67 ml de sangre por kg de peso vivo (Morton et al., 1993), un jerbo de nuestro estudio, con peso medio de 75 g, contará con 5 ml de sangre. Así pues, en teoría, es posible extraer entre 0,5 (10%) y 0,75 (15%) ml. Extracciones del 15% requieren dos semanas, o una semana en el caso del 7,5%, para la recuperación de los animales adultos (Diehl et al., 2001). Podrían extraerse muestras del 1% cada 24 horas (Morton et al., 1993).

Como nuestro experimento consiste en provocar anemia, para no agudizarla, nunca se tomaron muestras de sangre superiores a 0,35 ml (7%) y siempre se respetó un mínimo de 9 días entre muestreos, ampliándose el tiempo entre extracciones a medida que se repetía la toma de muestras en un mismo lote.

La utilidad de los valores obtenidos de referencias bibliográficas depende de muchos factores, como pueden ser especie, raza, sexo, edad, nutrición, condiciones ambientales y la técnica de obtención de muestras o el método analítico (Quimby, 1989; Meeks, 1989).

4.1. PESO

Según Cano Rábano et al. (1999-2000), el peso del jerbo aumenta progresivamente hasta los 6 meses, momento en el cual se le considera ya adulto, creciendo más los machos y alcanzando el peso adulto antes que las hembras.

El peso medio de nuestros animales al principio del experimento, con 6-7 meses de edad, era de $75,43 \pm 4,30$ g y al finalizar de $77,33 \pm 1,51$ g. La literatura refleja valores para animales adultos de 50-90 g (Robinson, 1979; Laber-Laird, 1996). Norris (1987) describió que el jerbo adquiere su peso adulto prácticamente a los 90 días publicando valores de 60 g para los machos. Marston (1976) observó, a los 6 meses de edad, pesos de 75-105 g para los machos. Illera et al. (1993) citan valores de 65,5 g para jerbos macho de 4-5 meses y Loew (1968), de 78,7-103,0 g para machos de 6,5 meses.

Así, dependiendo de con qué autores comparemos nuestros datos los encontraremos en el rango de la normalidad, por encima o en el límite inferior.

Una vez provocada la anemia, observamos un descenso significativo del peso hasta el día 3, en el que alcanza el mínimo, con 67,86 g; a partir de ese momento se produce la recuperación significativa de los valores el día 28, llegando posteriormente a superar el peso inicial el día 36 aunque sin ser estadísticamente significativo.

Flanagan y Lessler (1970) emplean una dosis de PHZ de 50 mg/kg vía intraperitoneal, cada dos días durante 6 días, en ratas macho Wistar con un peso de 300-490 g. El peso se redujo progresivamente pero no proporcionan datos de la recuperación ya que sólo tomaron valores en los 8 primeros días obteniendo pesos de 418, 412, 405, 390 y 365 g los días 0, 2, 4, 6 y 8, respectivamente. A pesar de ser dosis repetidas el peso decae a un ritmo más lento que el nuestro hasta el día 6 en el que sigue descendiendo debido al uso de dosis repetidas y mientras que en nuestro estudio comienza la recuperación.

Nuestro experimento es comparable con el de Ades y Cascarano (1979), en el que, utilizan una dosis de 60 mg/kg vía subcutánea, cada 2 días, durante 28 días en ratas macho Sprague-Dawley de 295-305 g. La evolución del peso con respecto al 100% del día 0 es la siguiente: día 1, 98%, día 3, 93%, día 6, 90%, día 10, 88%, día 15, 92%, día 21, 98% y día 28, 104%. La caída de peso los 3 primeros días es comparable a la sufrida por nuestros jerbos, día 1, 96% y día 3, 90%, pero en su experimento el peso sigue en descenso debido a la repetición de las dosis.

Por lo tanto el peso se ve afectado más en el jerbo que en la rata por el empleo de la PHZ.

4.2. PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS

4.2.1. GLÓBULOS ROJOS

Los primeros datos encontrados en la bibliografía son los publicados por Mays (1969) que describe valores de glóbulos rojos entre $7,87$ y $9,97 \times 10^6/\mu\text{l}$ con un valor medio de $8,84 \pm 0,5 \times 10^6/\mu\text{l}$. Estos datos están en consonancia con Termer y Glomsky (1978) quienes citan valores medios, para machos de 7 meses, de $8,8 \pm 0,4 \times 10^6/\mu\text{l}$ y Rosa y Glomsky (1981), quienes refieren valores medios para individuos machos de $8,3 \pm 0,2 \times 10^6/\mu\text{l}$.

Nuestro grupo de investigación ha publicado valores de jerbos macho de $9,70 \times 10^6/\mu\text{l}$ en animales de 6-8 meses (Cano Rábano et al., 1999) y de $9,23 \times 10^6/\mu\text{l}$ en animales de 6-12 meses (Cano Rábano et al., 2001).

Al comienzo del protocolo el valor medio para nuestros jerbos fue de $7,89 \pm 0,53 \times 10^6/\mu\text{l}$ y al finalizar, en el día 55, de $8,46 \pm 0,80 \times 10^6/\mu\text{l}$.

Observamos que los datos obtenidos en el presente experimento se encuentran por debajo de las medias citadas en la bibliografía tanto al comienzo como al final del mismo. Ello es debido a que empleamos una cepa diferente a la empleada previamente por nuestro grupo de investigación.

Encontramos en la literatura diferencias en valores en jerbos de menor edad. Así, Zeman (1967) describe valores medios para individuos macho de 10 semanas de $9,38 \pm 1,0 \times 10^6/\mu\text{l}$ y Kim y Lee (2006), de $6,2 \pm 0,95 \times 10^6/\mu\text{l}$ para jerbos macho con 7 semanas de edad.

En nuestro experimento, el valor medio más bajo se alcanzó el día 3 con $2,30 \pm 0,60 \times 10^6/\mu\text{l}$, aumentando progresivamente hasta su valor medio más alto el día 55 con $8,46 \pm 0,80 \times 10^6/\mu\text{l}$ (Gráfica 2). Del estudio estadístico se deduce que la recuperación fue efectiva el día 28.

Burkhard et al. (2001), utilizando una única dosis de 50 mg/kg intraperitoneal en ratas Sprague-Dawley encontraron valores de 6,4; 4,8; 3,3 y $5,5 \times 10^6/\mu\text{l}$ los días 0, 1, 4 y 8, respectivamente. Estos datos siguen el patrón de los nuestros pero en menor intensidad, ya sea debido a la utilización de una menor dosis o a que la rata

es más resistente a la acción de la PHZ que los jerbos. Podemos afirmar que el jerbo es más sensible a la acción de la PHZ si observamos el experimento de Berger (1985), quien utilizando una dosis única de 90 mg/kg intraperitoneal, en ratas Wistar macho con 2 meses de edad obtienen el día 0 valores de $6,59 \times 10^6/\mu\text{l}$ y de 4,60; 2,98; 4,10 y $6,06 \times 10^6/\mu\text{l}$ los días 1, 3, 7 y 14, respectivamente. Aún utilizando una dosis muy superior a la nuestra, describe una anemia menos aguda y con una más pronta recuperación que en nuestro caso.

El empleo de PHZ administrada por vía subcutánea provoca una anemia más leve debido a una absorción más lenta del agente oxidante. Así, Naeshiro et al. (1998) utilizan una única dosis de 50 mg/kg subcutánea en ratas macho de 7 semanas y obtienen valores de glóbulos rojos de 7,0; 6,2; 5,8; 5,5; 5,9 y $6,6 \times 10^6/\mu\text{l}$ los días 0, 1, 2, 4, 6 y 13. Dornfest et al. (1990) utilizan una única dosis de 40 mg/kg subcutánea en ratas Long-Evans macho de 7 semanas y 150-200 g. Obtienen valores de glóbulos rojos de 6,5; 4,8; 4,4; 4,3; 5,5; 5,0 y $5,9 \times 10^6/\mu\text{l}$ los días 0, 2, 3, 4, 5, 6 y 11, respectivamente.

Rokushima et al. (2007) observan que una única dosis de 80 mg/kg vía intraperitoneal, en ratas hembra Sprague-Dawley de 4 semanas de edad, tiene un efecto más leve que una dosis de 20 mg/kg aplicada durante 4 días consecutivos. Así, parten de $5,8 \times 10^6/\mu\text{l}$ el día 0; el día 1, en las ratas de dosis de 80 mg/kg obtienen $4 \times 10^6/\mu\text{l}$ mientras que en las ratas de 20 mg/kg el mismo día tienen $5,5 \times 10^6/\mu\text{l}$ y el día 4, $3,5 \times 10^6/\mu\text{l}$. Observamos que para una misma cantidad de PHZ si es aplicada en dosis repetidas tiene un mayor efecto oxidante.

Más evidencias sobre la resistencia de la rata a la oxidación las encontramos al comparar los datos obtenidos por Criswell et al. (2000) y Mejía et al. (2008). Ambos protocolos consiguen una anemia similar a la nuestra al administrar 150 mg/kg totales repartidos en 3 y 2 dosis, respectivamente. Así, Criswell et al. (2000), utilizando una dosis de PHZ de 50 mg/kg intraperitoneal, 3 días consecutivos, en ratas macho Wistar de 40 días y 125-150 g pasando de $6,77 \times 10^6/\mu\text{l}$ el día 0 a $2,08 \times 10^6/\mu\text{l}$ el día 2, retomando la normalidad el día 28; mientras que Mejía et al. (2008), con una dosis diaria de 75 mg/kg intraperitoneal durante 2 días, en ratas Wistar de 7 días de edad, sacrificadas el día 3 obtienen valores de glóbulos rojos de $11,07 \times 10^6/\mu\text{l}$ y $2,84 \times 10^6/\mu\text{l}$ los días 0 y 3, respectivamente.

Por lo tanto y a la vista de los resultados podemos concluir que el jerbo es más sensible a la acción oxidante de la PHZ que diferentes cepas de rata como Wistar, Sprague-Dawley y Long-Evans entre otras.

Hemos encontrado datos en la literatura que indican que el ratón también es más resistente a la acción oxidante PHZ que el jerbo aún utilizando dosis más altas. En este sentido Cromer et al. (2006) utilizan una dosis de 60 mg/kg durante dos días consecutivos vía intraperitoneal, en ratones Balb/c de 7-8 semanas obteniendo valores de 6,0; 4,6; 2,5; 4,5 y 5,9 x 10⁶/μl los días 0, 1, 3, 6 y 10, respectivamente. Valores similares son los obtenidos por Goossens et al. (2009) empleando también 2 dosis de 60 mg/kg durante dos días consecutivos vía intraperitoneal obteniendo 7,8; 3,5; 5,5; 6,7 y 6,9 x 10⁶/μl los días 0, 4, 6, 8 y 12, respectivamente.

En el caso del empleo de dosis crónicas, Paul et al. (1999) utilizando una dosis de 25 mg/kg, vía intraperitoneal, cada dos días durante 70 días en ratones de 2 meses de edad obtienen 9,9 x 10⁶/μl el día 0 y 6,4 x 10⁶/μl el día 70. Esto indica que si la dosis no es muy elevada y es administrada de manera crónica el organismo adapta el sistema hematopoyético a la sobreestimulación apareciendo reticulocitosis siendo además los reticulocitos más resistentes a la oxidación por lo cual el empleo de dosis de PHZ no es tan eficaz para provocar anemia en el caso de una elevada concentración de reticulocitos (Burkhard et al., 2001).

En cuanto al conejo, podemos afirmar que es una especie especialmente sensible a la acción de la PHZ. Así, Sheeler y Barber (1965) utilizan una dosis intramuscular de 8 mg/kg dos días consecutivos, en conejos Nueva Zelanda macho de 2-3 kg, citando valores de 5,91; 5,38; 3,59; 2,70; 3,69; 4,68 y 5,18 x 10⁶/μl los días 0, 1, 3, 6, 10, 15 y 19 respectivamente. Empleando una dosis muy inferior y una vía con una menor velocidad de absorción que la utilizada por nosotros provoca una anemia aguda y con una pauta de recuperación muy parecida a la nuestra.

Sharma et al. (1991) emplean una única dosis de 60 mg/kg intravenosa en terneros de raza Holstein. Los valores obtenidos para los glóbulos rojos fueron de 6,5; 5,7; 5,5; 5,6; 5,7 y 5,8 x 10⁶/μl, los días 0, 1, 2, 3, 4 y 5, respectivamente, lo que indica que el vacuno es especialmente resistente a la acción de la PHZ ya que provoca un descenso máximo del 15%.

4.2.2. HEMATOCRITO

Los primeros valores que encontramos en la literatura son referidos por Zeman (1967), quien cita valores medios para jerbos macho de 2,5 meses de $59,45 \pm 12\%$. Estudios posteriores citan valores de hematocrito más bajos; así Mays (1969) observó en jerbos macho, valores de entre 46 y 52% con una media de $49,25 \pm 2,0\%$; Dillon y Glomsky (1975) describen valores para individuos machos de 44-49% con una media de 47,5%; Termer y Glomsky (1978) refieren valores medios para individuos machos de 7 meses de $47,0 \pm 2,1\%$ y Rosa y Glomsky (1981) publican valores medios para individuos machos de $43,5 \pm 1,7\%$.

Trabajos más recientes citan datos similares como los obtenidos por nuestro grupo de trabajo, en jerbos macho de 6-8 meses con una media de 48,98% (Cano Rábano et al., 1999), en jerbos de 6-12 meses con valores de 45,00% (Cano Rábano et al. 2001) y los más recientes, aportados por Kim et al. (2006), quienes describen valores medios para jerbos macho con edad de 7 semanas de $40,20 \pm 1,57\%$.

Al comienzo de nuestro protocolo el valor medio fue de $45,54 \pm 3,62\%$ y al finalizar el día 55 de $50,26 \pm 3,74\%$ por lo cual nuestros datos se encuentran entre los descritos anteriormente.

En nuestro estudio el valor medio más bajo se alcanzó el día 3 con $11,94 \pm 3,00\%$, aumentando progresivamente hasta alcanzar su valor medio más alto el día 55 con $50,26 \pm 3,74\%$ (Gráfica 4). Del estudio estadístico se deduce que la recuperación fue efectiva el día 15. La recuperación del hematocrito es más rápida que la recuperación del número de eritrocitos, el día 28, debido al aumento del VCM de los reticulocitos más que a la cantidad de nuevos eritrocitos circulantes (Berger, 1985).

Si lo comparamos con el referido por otros autores utilizando dosis similares observamos que el descenso es menos acusado en las diferentes cepas de la rata, al igual que sucedía con el recuento de eritrocitos, dado que el hematocrito es proporcional al número de eritrocitos. Así, Iversen et al. (1992) utilizando una única dosis de PHZ de 50 mg/kg intraperitoneal, en ratas Wistar con un peso de 380-420 g, encontraron valores del 38% de hematocrito en el día 0 para descender al 30% el día 1 y al 22% el día 3; Burkhard et al. (2001) emplean una única dosis de 50

mg/kg intraperitoneal en ratas Sprague-Dawley con datos del 41% para el día 0, 29% el día 1, 28% el día 4 y de 46% el día 8.

Comparando con protocolos que emplean dosis significativamente menores y vías diferentes vemos que la repercusión en este parámetro es aún menor. Así Conrad et al. (1965) utilizando una única dosis de 40 mg/kg intramuscular en ratas macho de 225-275 g obtuvieron valores para el hematocrito del 47,7; 40,5; 35,2; 37,7; 41,3 y 44,3% los días 0, 1, 3, 5, 14 y 30, respectivamente y Dornfest et al. (1990) utilizando la misma dosis pero vía subcutánea en ratas Long-Evans macho de 7 semanas y 150-200 g obtuvieron valores del hematocrito de 43, 35, 32, 36, 40, 43 y 48% los días 0, 2, 3, 4, 5, 6 y 11 respectivamente, recuperándose el día 6.

Otros autores han empleado dosis significativamente mayores y aun así, el descenso del hematocrito ha sido más moderado. Berger (1985), utilizando una dosis única de 90 mg/kg intraperitoneal, en ratas Wistar macho con 2 meses de edad obtuvieron valores para el hematocrito de 43% el día 0, 27% el día 1, 23% el día 3, 44% el día 7 y 48% el día 14, afirmando que los altos niveles de hematocrito en el día 14 son debidos al incremento del VCM. Luangaram et al. (2006) utilizan una única dosis de 125 mg/kg intraperitoneal en ratas Sprague-Dawley macho de 230-250 g, siendo el hematocrito, en este caso, del 46,9% el día 0 y del 23,3% el día 2.

Incluso con dosis similares a las nuestras y repetidas, la rata acusa menos el descenso del hematocrito que el jerbo. Flanagan y Lessler (1970) emplean una dosis de 50 mg/kg intraperitoneal, cada dos días, durante 6 días en ratas macho Wistar con 300-490 g y obtienen un 49, 38, 31, 30 y 29% los días 0, 2, 4, 6, 8, respectivamente. Sí encontramos un descenso similar al nuestro en el caso de animales muy jóvenes y dosis altas; así, Mejía et al. (2008) utilizan una dosis diaria de 75 mg/kg intraperitoneal, durante 2 días, en ratas Wistar de 7 días de edad sacrificadas al tercer día, obteniendo valores del 34% y del 9,42%, los días 0 y 3 respectivamente.

En cuanto al uso crónico de dosis de PHZ hemos encontrado que Redondo et al. (1995) utilizando una dosis diaria de 12,5 mg/kg intraperitoneal, 21 días consecutivos, en ratas Wistar macho con 3 meses de edad y un peso de 325 g, obtuvieron valores para el hematocrito de 43, 39, 34, 30, 35 y 48% los días 0, 1,

3, 6, 10 y 28, respectivamente. Pesquero et al. (2000) utilizan una dosis de 12,5 mg/kg durante 8 días en ratas Sprague-Dawley macho de 300-400 g, refiriendo el día 0 valores del 46,7% y el día 9, del 31,5%. Naughton et al. (1989) empleando una dosis intraperitoneal inicial de 40 mg/kg y posteriormente una dosis de 20 mg/kg, cada 7 días durante 6 semanas, en ratas macho Long-Evans de 165-235 g, encuentran valores del 45, 42, 33, 35, 38, 37 y 45%, los días 0, 3, 5, 7, 14, 21 y 42, respectivamente. Esto indica que si la dosis es baja y se administra de manera crónica el organismo se adapta estimulando la eritropoyesis con reticulocitos con un mayor VCM y más resistentes a la oxidación (Burkhard et al., 2001).

En el caso del ratón también comprobamos que aunque se utilicen dosis más altas de PHZ, esta especie presenta una mayor resistencia que el jerbo a la anemia oxidativa y por lo tanto una más pronta recuperación. Así, Lenox et al. (2009) emplean una dosis de 100 mg/kg intraperitoneal en ratones presentando un hematocrito del 55% el día 0, 35% el día 1, 32% el día 3, 48% el día 6 y 52% el día 8; Vannuncchi et al. (2001) utilizan una dosis de 60 mg/kg intraperitoneal, dos días consecutivos, en ratones presentando un hematocrito del 47% el día 0, 27% el día 3, 45% el día 6 y 48% el día 10; Ajioka et al. (2002) utilizan una única dosis de 150 mg/kg intraperitoneal en ratones y describen valores para el día 0 del 48% y para el día 5 del 31,5% y Zivni et al. (2008) emplean una única dosis de 80 mg/kg intraperitoneal en ratón de entre 42 y 56 días y obtienen valores de hematocrito del 45, 30,6 y 45% los días 0, 3 y 7, respectivamente.

El ratón, al igual que la rata, presenta una alta resistencia cuando se utilizan dosis crónicas de agente oxidante debido al aumento del número de reticulocitos lo que conlleva a un aumento del VCM (Berger, 1985) y al aumento de la resistencia a la oxidación de los reticulocitos (Burkhard et al., 2001). Así, Paul et al. (1999) utilizan una dosis de 25 mg/kg intraperitoneal cada dos días durante 10 semanas en ratones de 2 meses de edad con valores de hematocrito del 48,9% el día 0, 34% el día 7, 27% el día 14, 30% el día 21, 35% el día 28, 38% el día 35, 37% el día 42, 36% el día 49, 38% el día 56 y 36% el día 70.

En el caso del empleo de PHZ en conejos, Benestad e Iversen (1983) utilizan una única dosis de 12 mg/kg subcutánea en conejos de 2,5-3 kg y obtienen valores de hematocrito del 40, 33, 26, 31, 38 y 41% los días 0, 1, 3, 6, 10 y 15, respectivamente. Sheeler y Barber (1965) utilizan una dosis intramuscular de 8

mg/kg dos días consecutivos en conejos Nueva Zelanda macho de 2-3 kg encontrando valores del 41% el día 0, 36% el día 1, 23,8% el día 3, 23,8% el día 6, 31,6% el día 10, 38,9% el día 15 y 41,2% el día 19. Ambos emplean dosis muy inferiores a las nuestras y una vía con una menor velocidad de absorción del oxidante provocando aun así una anemia aguda por lo que el conejo es una especie especialmente sensible a la acción de la PHZ.

Estudiando la utilización de la PHZ en perros observamos una pauta de descenso similar pero una recuperación más prolongada que en los roedores. Muirhead et al. (1954) utilizan una única dosis de 40 mg/kg intravenosa en perros mestizos de 5,5-11 kg. Encuentran valores de hematocrito del 36,4; 31,3; 20,7; 14,0; 24,0; 27,5; 29,7; 29,4; 31,2 y 32,4% para los días 0, 1, 3, 6, 10, 16, 20, 28, 35 y 41, respectivamente. Harley y Mauer (1960) utilizan una única dosis de 50 mg/kg intravenosa en perros de raza mestiza empezando el hematocrito en 51% y disminuyendo al 44% a los 15 minutos, al 46% a los 30 minutos, al 49% a las 2 horas, al 43% a las 4 horas, al 44% a las 6 horas y al 42% a las 8 horas. La recuperación más lenta es debida a que cuentan con una eritropoyesis más reducida que los roedores consecuencia de un mayor tiempo de supervivencia de sus eritrocitos (120 días) (Jain, 1993).

La PHZ en terneros al igual que en el número de glóbulos rojos, provoca un descenso más leve que en el jerbo. Así, Sharma et al. (1991) que utilizan una única dosis de 60 mg/kg intravenosa en terneros de raza Holstein obteniendo un 35% el día 0, un 28% el día 1, 27% el día 3 y 28% el día 6.

4.2.3. HEMOGLOBINA

Las primeras referencias en la literatura son las aportadas por Zeman (1967) quien describe valores medios para jerbos macho de 2,5 meses de $14,6 \pm 2,1$ g/dl. En estudios posteriores, Dillon y Glomsky (1975) citan valores para individuos macho de 13,8-16,2 g/dl con media de 14,75 g/dl; Termer y Glomsky (1978) publica valores medios, también en machos de 7 meses, de $15,1 \pm 0,7$ g/dl; Rosa y Glomsky (1981) refieren valores medios para individuos macho de $14,9 \pm 0,4$ g/dl e Illera et al. (1993) describen valores de hemoglobina de 15,66 g/dl para jerbos macho de 4-5 meses.

Más recientes son los estudios elaborados por nuestro grupo de trabajo que describen valores de 16,06 g/dl en jerbos macho de 6-8 meses (Cano Rábano et al., 1999) y de 14,90 g/dl en jerbos de 6-12 meses (Cano Rábano et al., 2001) y por Kim et al. (2006) quienes obtienen valores de $11,3 \pm 1,54$ g/dl para jerbos macho de 7 semanas de edad.

Al comienzo de nuestro protocolo el valor medio era de $13,90 \pm 0,38$ g/dl y al finalizar de $14,43 \pm 1,06$ g/dl, por lo cual nuestros resultados se encuentran en el límite inferior de la mayoría de las referencias bibliográficas porque hemos empleado una estirpe diferente a la de nuestro grupo de investigación.

El día 3 es el momento de mayor destrucción eritrocitaria como muestran los valores del número de eritrocitos y del hematocrito, no descendiendo en la misma proporción la cantidad de hemoglobina. Ello es debido a que el contador hematológico asume que la hemoglobina libre en el plasma debido a la hemólisis está presente dentro de los eritrocitos, ya que para calcularla por el método de referencia precisa la lisis de todos los eritrocitos para luego medir la hemoglobina mediante espectrofotometría.

Así mismo hay que tener en cuenta que los cuerpos de Heinz están presentes en la sangre de los animales tratados con PHZ, de manera que se ve aumentada falsamente la cantidad de hemoglobina al incrementarse la turbidez del plasma provocando un error en el contador hematológico. Estos aspectos deben tenerse en cuenta a la hora de interpretar los resultados de muchos de los parámetros en los que influye la hemoglobina como son la HCM y la CHCM. (Redondo et al., 1995).

La hemoglobina libre en el plasma, debido a la acción de la PHZ, reduce la ratio hematocrito:hemoglobina de 3:1 a 2,02:1 el día 3 (Criswell et al., 2000), de tal forma que se falsea la HCM y la CHCM al calcularse éstas de manera indirecta utilizando el valor de la hemoglobina. En nuestro caso la ratio hematocrito:hemoglobina pasa de 3,27:1 en condiciones normales a alcanzar su valor más bajo el día 3 con 2,33:1.

La hemoglobina libre en el plasma, consecuencia de la hiperhemólisis, tiene una alta afinidad por el óxido nítrico al que se une; seguidamente, la oxihemoglobina se oxida espontáneamente a metahemoglobina lo que lleva a la producción de

radicales superóxido y peróxido de hidrógeno (Everse y Hsia, 1997). Además, la presencia de hemoglobina libre reduce la biodisponibilidad de óxido nítrico, provocando una disfunción endotelial y contribuyendo a provocar una hipertensión pulmonar y una vasoconstricción general, de forma que disminuye la tasa de filtración glomerular y por tanto la ratio de eliminación de muchas de las enzimas estudiadas (Ballas y Marcolina, 2006).

La haptoglobina es una glicoproteína plasmática que forma complejos estables con la hemoglobina libre en el plasma evitando así la filtración glomerular de la hemoglobina y reduciendo el daño renal debido a la hemólisis intravascular, de tal forma que disminuye o incluso desaparece si la hemólisis es importante (Lim, 2001).

Al comienzo de nuestro protocolo el valor medio de hemoglobina era de $13,90 \pm 0,38$ g/dl y al finalizar, de $14,43 \pm 1,06$ g/dl. El valor medio más bajo se alcanzó el día 3 con $5,12 \pm 1,84$ g/dl, aumentando progresivamente hasta su valor medio más alto el día 55 con $14,43 \pm 1,06$ g/dl (Gráfica 3). Del estudio estadístico se deduce que la recuperación fue efectiva el día 15.

Analizando experimentos realizados en ratas con dosis únicas y similares a la utilizada por nosotros observamos que el descenso en el nivel de hemoglobina es equivalente aunque el tiempo de recuperación de la rata es menor. Burkhard et al. (2001) utilizan una única dosis de 50 mg/kg intraperitoneal en ratas Sprague-Dawley y obtienen valores de hemoglobina de 13,9; 10; 4,9 y 14,8 g/dl los días 0, 1, 4, y 8, respectivamente. Iversen et al. (1992) emplean una única dosis de PHZ de 50 mg/kg intraperitoneal, en ratas Wistar con un peso de 380-420 g y obtienen 14 g/dl el día 0, 10 g/dl el día 1 y 7 g/dl el día 3.

Al igual que en el caso anterior, con dosis repetidas, el grado de disminución de la hemoglobina es similar pero la recuperación es más pronta en la rata. Diallo et al. (2008) utilizan una dosis de 40 mg/kg, vía intraperitoneal dos días consecutivos en ratas Wistar de ambos sexos de 150-200 g, y encuentran valores de hemoglobina de 12,8 g/dl el día 0, 6,5 g/dl el día 2, 8,9 g/dl el día 7, 12,0 g/dl el día 10 y 13,73 g/dl el día 15. Sucede lo mismo en el experimento de Criswell et al. (2000), quienes utilizando una dosis de PHZ de 50 mg/kg intraperitoneal, 3 días consecutivos, en ratas macho Wistar de 40 días y 125-150 g obtuvieron 14 g/dl y

6,2 g/dl los días 0 y 2, respectivamente. En este caso la hemoglobina alcanzó valores normales el día 28.

También aparecen en la literatura protocolos con utilización de dosis más bajas y mayor cronicidad. Así Redondo et al. (1995) emplean una dosis diaria de 12,5 mg/kg intraperitoneal, 21 días consecutivos, en ratas Wistar macho con 3 meses de edad y un peso de 325 g siendo la hemoglobina obtenida de 16 g/dl, 12,5 g/dl y 10,9 g/dl los días 0, 3 y 10, respectivamente. Pesquero et al. (2000) utilizan una dosis de 12,5 mg/kg durante 8 días en ratas Sprague-Dawley macho de 300-400 g y obtienen 15,4 g/dl el día 0 y 6,7 g/dl el día 9. En este caso la recuperación no es tan rápida como en el hematocrito debido a la reticulocitosis ya que los reticulocitos no están saturados de hemoglobina.

Rokushima et al. (2007) observan que una única dosis de 80 mg/kg vía intraperitoneal, en ratas hembra Sprague-Dawley de 4 semanas de edad, tiene un efecto más leve que una dosis de 20 mg/kg aplicada durante 4 días consecutivos. Así, parten de 12 mg/dl el día 0; el día 1, en las ratas con dosis de 80 mg/kg obtienen 9,8 g/dl mientras que en las ratas de 20 mg/kg el mismo día presentan 11,5 g/dl y el día 4 8 g/dl. Observamos que para una misma cantidad de PHZ si es aplicada en dosis repetidas tiene un mayor efecto oxidante.

En el caso del conejo podemos afirmar que la pauta de descenso y recuperación de la hemoglobina es parecida al jerbo con el empleo dosis menores a las nuestras. Así McMullin et al. (1989) utilizando una única dosis de 20 mg/kg, vía intraperitoneal en conejos de 4 kg, obtienen valores de hemoglobina de 12,8; 11,8; 7,7; 6,3; 7,0; 8,2 y 9,8 g/dl los días 0, 1, 3, 7, 9, 11 y 16, respectivamente. Benestad e Iversen (1983) utilizan una única dosis de 12 mg/kg subcutánea en conejos de 2,5-3 kg y obtienen 12,2 g/dl el día 0, 10,7 g/dl el día 1, 8,0 g/dl el día 3, 7,8 g/dl el día 6, 9,5 g/dl el día 10 y 11 g/dl el día 15. Sheeler y Barber (1965) utilizando una dosis intramuscular de 8 mg/kg, dos días consecutivos, en conejos Nueva Zelanda macho de 2-3 kg obtienen 12,2; 9,7; 6,0; 5,7; 8,6; 10,6 y 10,9 g/dl los días 0, 1, 3, 6, 10, 15 y 19.

En cuanto a la utilización de PHZ en perros, el grado de disminución de la hemoglobina es mayor que en jerbos, así como el tiempo de su recuperación debido a una eritropoyesis menos intensa que la de los roedores (Jain, 1993). Muirhead et

al. (1954) utilizan una única dosis de 40 mg/kg intravenosa en perros mestizos de 5,5-11 kg obteniendo valores de 11,0; 9,4; 6,1; 2,2; 6,0; 7,1; 8,7; 8,9; 9,2 y 11,8 g/dl los días 0, 1, 3, 6, 10, 16, 20, 28, 35 y 41, respectivamente. También cabe reseñar el estudio de Harley y Mauer (1960), quienes con una única dosis de 50 mg/kg intravenosa en perros de raza mestiza encuentran 17,8 g/dl en el minuto 0, 12,2 g/dl a los 15 minutos, 13 g/dl a los 30 minutos, 13,8 g/dl a las 2 horas, 12,2 g/dl a las 6 horas, y 11,8 g/dl a las 8 horas.

La PHZ, en terneros, provoca un descenso más leve que en el jerbo, al igual que en el número de eritrocitos y hematocrito. Sharma et al. (1991) utilizan una única dosis de 60 mg/kg intravenosa en terneros de raza Holstein y obtienen 8,5; 7,8; 7,6 y 9 g/dl los días 0, 1, 3 y 5, respectivamente. Destaca la aparición de hemoglobinuria los primeros días, del mismo modo que ocurre en nuestros jerbos los días 1 y 3.

4.2.4. RETICULOCITOS

Los únicos datos hallados en la bibliografía son los de Dillon et al. (1975) quienes describen valores normales de reticulocitos para jerbos macho de entre 2 y 5% con una media del 3%.

Cuando los mecanismos de la respuesta medular están intactos, la reticulocitosis se desarrolla dentro de las 48 horas una vez comenzada la anemia, con un pico máximo hacia los 4-7 días.

En nuestro experimento, el recuento de reticulocitos el día 0 fue del 3%, aumentando progresivamente el día 1 hasta el 5%, el día 3 al 24%, el día 6 al 28% alcanzando su valor medio más alto el día 10 con el 40%, para volver a descender, paulatinamente, hasta el día 28 al 4% momento en el cual recupera el valor del principio del experimento manteniéndose en esas cifras hasta el final del mismo. El tiempo de maduración relativamente corto no posibilita la acumulación de cantidades aún mayores que reflejen el porcentaje regenerativo (Jain, 1993).

La aparición de un alto porcentaje de reticulocitos en la circulación está asociada a un incremento en el VCM y la HCM, no obstante la CHCM disminuye durante la respuesta de los reticulocitos ya que estas células jóvenes no están en posesión de

su capacidad total de hemoglobina, es decir, aunque los reticulocitos presentan una cantidad mayor de hemoglobina que los eritrocitos, la CHCM, que representa el peso de la hemoglobina en función del volumen de la célula, es menor ya que el eritrocito adulto está saturado de hemoglobina en condiciones fisiológicas (Sheeler y Barber, 1965) y la síntesis de hemoglobina continúa en los reticulocitos hasta su maduración (Meyer y Harvey, 2004).

Comparando con dosis únicas similares a las nuestras, observamos que la cantidad de reticulocitos es significativamente menor en la rata que en el jerbo ya que también el daño eritrocitario es mayor en este último. Burkhard et al. (2001) utilizan una única dosis de 50 mg/kg intraperitoneal en ratas Sprague-Dawley y obtienen los siguientes recuentos de reticulocitos: 1% el día 0, 1,7% el día 1, 2,4% el día 4 y 3% el día 8. Iversen et al. (1992) emplean una única dosis de PHZ de 50 mg/kg intraperitoneal, en ratas Wistar con un peso de 380-420 g, comenzando con 1,5% de reticulocitos el día 0 para aumentar al 5% el día 1 y al 9% el día 3.

La utilización de dosis más altas o repetidas sí produce una cantidad de reticulocitos similar a la de nuestro protocolo. Berger (1985) empleando una dosis única de 90 mg/kg intraperitoneal, en ratas Wistar macho con 2 meses de edad obtiene valores de reticulocitos de 5,52; 11,4; 37,5; 47,8 y 7,49% los días 0, 1, 3, 7 y 14, respectivamente.

Con dosis altas y repetidas aparece una reticulocitosis superior a nuestro experimento. Así Flanagan y Lessler (1970) emplean una dosis de 50 mg/kg intraperitoneal, cada dos días durante 6 días, en ratas macho Wistar con 300-490 g y obtienen unos valores de reticulocitos del 2,2% el día 0, 7,4% el día 2, 22,5% el día 4, 52,0% el día 6 y 70,1% el día 8. Criswell et al. (2000), empleando una dosis de PHZ de 50 mg/kg intraperitoneal, 3 días consecutivos, en ratas macho Wistar de 40 días y 125-150 g, obtuvieron un nivel del 99,8% de reticulocitos en sangre el día 4, que no descendió a la normalidad (3,7%) hasta el día 56. Cuanto menor es el espacio de tiempo que transcurre entre la repetición de las dosis, mayor es la reticulocitosis.

Debido a la rápida maduración de los reticulocitos los niveles se mantienen relativamente bajos a pesar del empleo de dosis bajas y de manera crónica. Así, Redondo et al. (1995) utilizan una dosis diaria de 12,5 mg/kg intraperitoneal, 21

días consecutivos, en ratas Wistar macho con 3 meses de edad y un peso de 325 g y obtuvieron valores de reticulocitos del 3,6% el día 0, 5% el día 3, alcanzando un máximo de 11,64% el día 11.

En el caso del ratón, el incremento del número de reticulocitos es inferior al del jerbo incluso a dosis superiores. Así, Zivni et al. (2008) utilizan una única dosis de 80 mg/kg intraperitoneal, en ratones de entre 42 y 56 días, y obtienen un 5% de reticulocitos el día 0, un 22% el día 3, un 25% el día 5, un 15% el día 7 y un 10% el día 10. Ajioka et al. (2002) utilizando una única dosis de 150 mg/kg intraperitoneal obtienen valores de reticulocitos del 1% el día 0 y de 15% el día 15, no refiriendo los datos de la reticulocitosis aguda en los primeros días.

Encontramos una pauta similar a la de nuestro experimento con el empleo de dosis altas y repetidas. Así, Cromer et al. (2006) emplean una dosis de 60 mg/kg durante dos días consecutivos intraperitoneal en ratones Balb/c de 7-8 semanas y obtienen valores de 0,5; 6, 20 y 33% de reticulocitos los días 0, 1, 3 y 6, respectivamente. Vannuncchi et al. (2001) emplean una dosis de 60 mg/kg, vía intraperitoneal dos días consecutivos en ratones y obtienen valores de reticulocitos del 0,2% el día 0 y del 25% el día 3.

La actividad enzimática de los reticulocitos es más intensa que la de los glóbulos rojos maduros, en concreto de la catalasa, colinesterasa, glucosa 6 fosfato deshidrogenada y hexoquinasa entre otras, sugiriendo que en los reticulocitos la vía de las pentosas fosfato presenta una actividad importante (Friedman et al., 1962) y, por tanto, al presentar concentraciones mayores de enzimas antioxidantes son menos susceptibles a la oxidación inducida por PHZ (Burkhard et al., 2001), por lo cual el empleo de dosis repetidas de PHZ no es tan eficaz para provocar anemia en el caso de una elevada concentración de reticulocitos. Así, Paul et al. (1999) con dosis de 25 mg/kg intraperitoneal cada dos días durante 10 semanas en ratones de 2 meses de edad encuentran el día 0 un 1% de reticulocitos y el día 70, solamente un 32%.

El efecto de la PHZ en conejos es más acusado que en el jerbo ya que dosis muy inferiores pueden llegar a producir una reticulocitosis semejante a la de nuestro protocolo. Así, McMullin et al. (1989) emplean una única dosis de 20 mg/kg intraperitoneal en conejos de 4 kg obtienen valores de reticulocitos del 2, 4, 12, 34,

21 y 11% los días 0, 1, 3, 7, 11 y 16, respectivamente. Benestad e Iversen (1983) utilizaron una única dosis de 12 mg/kg subcutánea en conejos de 2,5-3 kg y obtuvieron un 2,2% el día 0, 3,3% el día 1, 4,0% el día 3, 9,0% el día 6, 10,0% el día 10 y 5,0% el día 15. Sheeler y Barber (1965) emplearon una dosis intramuscular de 8 mg/kg, dos días consecutivos en conejos Nueva Zelanda macho de 2-3 kg y obtuvieron valores de reticulocitos del 0,4; 0,8; 1,4; 12,9; 15,1; 4,0 y 1,1% los días 0, 1, 3, 6, 10, 15 y 19, respectivamente.

En el caso del perro, Muirhead et al. (1954) utilizando una única dosis de 40 mg/kg intravenosa en perros mestizos de 5,5-11 kg obtuvieron valores de reticulocitos del 0,3% el día 0, 0,7% el día 1, 1,8% el día 3, 11,4% el día 6, 7,6% el día 10, 1,4% el día 16, 0,7% el día 20, 0,3% el día 35 y 0,5% el día 41. Estos datos corroboran lo descrito en los parámetros hematocrito y hemoglobina, de que el sistema eritropoyético canino es menos activo que el de los roedores, ya que a pesar del agudo descenso descrito en dichos parámetros, la reticulocitosis encontrada es leve.

4.2.5. VOLUMEN CORPUSCULAR MEDIO

La primera referencia que encontramos en la literatura científica es la de Zeman (1967) quien describe valores medios para jerbos macho de 10 semanas de $63,3 \pm 9,0$ fl. Posteriormente, Mays (1969) cita en jerbos macho valores de entre 46,64 y 60,04 fl, con un valor medio de $54,46 \pm 3,7$ fl.

Estudios posteriores aportan datos similares a los de Mays. Así, Termer y Glomsky (1978) dan valores medios para jerbos macho de 7 meses de $54,0 \pm 1,4$ fl y Rosa y Glomsky (1981) describen valores medios para individuos machos de $52,7 \pm 1,4$ fl. Smith y Kapland (1976) publican que el jerbo reduce su VCM paulatinamente desde el nacimiento hasta su estado adulto valorando el VCM de jerbos en diferentes etapas de su desarrollo y encuentran que los animales recién nacidos presentan un VCM de 104,8 fl, a la semana de edad de 83,9 fl, a las 2 semanas de 73,5 fl, a las 3 semanas de 73,3 fl y a las 5 semanas, de 62,8 fl. También Kim et al. (2006) describen valores altos de VCM, ($62 \pm 1,0$ fl) para jerbos macho de 7 semanas. Este hecho explica el valor tan alto aportado por Zeman en 1967 al tratarse de animales de 10 semanas.

Nuestro grupo de investigación ha publicado valores en jerbos macho de 6-8 meses de $50,33 \pm 1,6$ fl (Cano Rábano et al., 1999) y en jerbos de 6-12 meses, de $47,41 \pm 1,0$ fl (Cano Rábano et al., 2001).

Al comienzo del protocolo el valor medio era de $57,15 \pm 2,60$ fl y al finalizar de $59,40 \pm 1,28$ fl de tal forma que nuestros valores han sido ligeramente superiores a los descritos por otros autores y significativamente mayores que los publicados anteriormente por nuestro mismo grupo de trabajo. Este hecho puede deberse a la utilización de diferentes estirpes de jerbos en ambos experimentos, encontrando así diferencias dentro de la misma especie.

El valor medio más bajo se alcanzó el día 1 con $47,68 \pm 0,65$ fl y fue aumentando progresivamente hasta su valor medio más alto el día 10 con $84,68 \pm 2,80$ fl, para volver a descender lentamente hasta el día 55 (Gráfica 5). Del estudio estadístico se deduce que la recuperación fue efectiva el día 55.

Según Jain (1993) el VCM aumenta y disminuye paralelo al número de reticulocitos, ya que son células inmaduras de mayor tamaño que los eritrocitos adultos, pero siempre bajo la perspectiva de que son necesarias muchas células grandes para incrementar el VCM por encima de su intervalo de referencia (Meyer y Harvey, 2004).

Estudiando el caso de la rata observamos que el aumento de VCM es similar al del jerbo. Burkhard et al. (2001) utilizando una única dosis de 50 mg/kg intraperitoneal en ratas Sprague-Dawley obtiene valores para el VCM de 63 fl el día 0, 59 fl el día 1, 83 fl el día 4 y previsiblemente seguiría aumentando ya que el día 4 no es el de mayor reticulocitosis. Realizan un histograma del volumen eritrocitario destacando la aparición en el día 4 de dos poblaciones diferenciadas, una correspondiente a hematíes de tamaño normal y otra población que se corresponde con la de los reticulocitos. El día 6 ya aparece en el histograma una sola población pero con una DS mayor que la del día 0. En el histograma, el día 0 aparece una curva de Gauss estrecha, el día 4 dos curvas de Gauss consecutivas y el día 8, una curva de Gauss más ancha que el día 0. En nuestro experimento también hemos detectado la aparición de dos poblaciones de glóbulos rojos, lo que se puede apreciar en la fotografía de los frotis correspondiente al día 6 del experimento.

Utilizando dosis más altas de PHZ, el aumento del VCM es aún mayor al nuestro. Así, Berger (1985) utiliza una dosis única de 90 mg/kg intraperitoneal, en ratas Wistar macho con 2 meses de edad y obtienen para el VCM valores de 64,3 fl el día 0, 57,9 fl el día 1, 77,5 fl el día 3, 107 fl el día 7 y 79,7 fl el día 14.

En cuanto a la recuperación de los valores normales de este parámetro podemos afirmar que es larga debido a la persistencia de un elevado VCM después de la recuperación y cuando los reticulocitos han retornado a su nivel basal. Este hecho se debe a la presencia de eritrocitos grandes que no presentan retículo (Sheeler y Barber, 1965). También corroborado por el estudio de Criswell et al. (2000), quienes utilizando una dosis de PHZ de 50 mg/kg intraperitoneal, 3 días consecutivos en ratas macho Wistar de 40 días y de 125-150 g, comprueban que el VCM no vuelve a valores normales hasta el día 56.

Con la utilización de dosis bajas y repetidas el aumento del VCM es más dilatado en el tiempo ya que la respuesta del sistema eritropoyético no es tan aguda. Redondo et al. (1995) utilizan una dosis diaria de 12,5 mg/kg intraperitoneal, 21 días consecutivos en ratas Wistar macho con 3 meses de edad y un peso de 325 g y obtienen valores para el VCM de 53,56; 57,16; 103; 88,36; 91,4; 60,43 y 58,6 fl los días 0, 3, 11, 14, 21, 29 y 36 respectivamente. Kakiuchi et al. (2006) utilizan una dosis de 3 mg/kg de acetilfenilhidracina, vía oral, durante 14 días en ratas macho de 6 semanas y obtienen valores de VCM de 57,2 fl el día 0 y 102,7 fl el día 14.

Apenas hemos encontrado datos sobre el VCM en la anemia aguda producida por PHZ en el ratón. En el caso de la administración de dosis crónicas de PHZ, Paul et al. (1999) emplean una dosis de 25 mg/kg intraperitoneal cada dos días durante 10 semanas en ratones de 2 meses de edad y obtienen valores de $50,4 \pm 0,4$ fl el día 0 y de $60,5 \pm 1,9$ fl el día 70 estando presente la reticulocitosis hasta el final del experimento en valores del 32% que se reflejan en el aumento del VCM.

Muy similares a los valores obtenidos por nuestro experimento son los publicados en conejos con dosis mucho más bajas y repetidas, debido a su alta sensibilidad a la PHZ, por Sheeler y Barber (1965) quienes utilizando una dosis intramuscular de 8 mg/kg, dos días consecutivos en conejos Nueva Zelanda macho de 2-3 kg

obtuvieron valores para el VCM de 69,6; 66,8; 66,4; 88,4; 107,5; 83,1 y 79,8 fl los días 0, 1, 3, 6, 10, 15 y 19 respectivamente.

4.2.6. ANCHO DE DISTRIBUCIÓN DE LOS GLÓBULOS ROJOS

No hemos encontrado valores en la bibliografía consultada referente a cifras de este parámetro en el jerbo.

En nuestro estudio, al comienzo del protocolo el valor medio era de $28,82 \pm 0,72$ y al finalizar de $30,23 \pm 1,02$. Su valor aumenta desde el día 0 paulatinamente hasta alcanzar su valor medio más alto el día 10 con $56,57 \pm 3,10$, para descender progresivamente el día 55 hasta su valor medio más bajo con $30,23 \pm 1,02$ (Gráfica 8). Del estudio estadístico se deduce que la recuperación fue efectiva el día 55.

El día 6 el contador hematológico no pudo calcular el RDW debido a la enorme variabilidad en el VCM de los eritrocitos en ese día, ya que el RDW es la DS del VCM expresado como % del VCM. Burkhard et al. (2001) después de administrar una dosis de 50 mg/kg intraperitoneal en ratas, realizaron un histograma del volumen eritrocitario en el cual aparecen el día 4 dos poblaciones diferenciadas; una de eritrocitos de tamaño medio y otra que se corresponde a la de los reticulocitos. En el día 6 aparece en el histograma una sola población pero con una media de volumen y una DS mayor que la del día 0. El error del contador hematológico en el día 6 de nuestro estudio es debido a la aparición repentina de esa segunda población.

Tampoco hemos encontrado en otras especies información para comparar el RDW con nuestros datos. Solamente el estudio de Criswell et al. (2000), que utilizando una dosis de PHZ de 50 mg/kg intraperitoneal, 3 días consecutivos en ratas macho Wistar de 40 días y 125-150 g, describen que el RDW sigue la misma pauta que el VCM y lo atribuyen a la reticulocitosis.

4.2.7. HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MEDIA

Los primeros datos fueron publicados por Zeman (1967) quien describe valores medios, en jerbos macho de dos meses y medio, de $15,5 \pm 1,5$ pg. Posteriormente,

Mays (1969) obtiene, también en jerbos macho, valores de entre 16,13 y 19,40 g/dl con un valor medio de $17,49 \pm 1,1$ pg.

En trabajos posteriores realizados en jerbos macho, aparecen cifras más elevadas que las de Zeman y más acordes con las de Mays. Así, Termer y Glomsky (1978), en animales de 7 meses encuentran valores medios de $17,2 \pm 0,5$ pg, Rosa y Glomsky (1981) publican valores de $17,9 \pm 0,6$ pg y Kim et al. (2006) de $18,8 \pm 1,53$ pg en animales de 7 semanas de edad.

Los valores publicados por nuestro grupo de trabajo, para jerbos macho de 6-8 meses de edad, son de 16,49 pg (Cano Rábano et al., 1999) y para jerbos de 6-12 meses, de 16,83 pg (Cano Rábano et al., 2001).

Al comienzo del presente protocolo, el valor medio era de $17,6 \pm 0,70$ pg y al finalizar de $17,03 \pm 1,30$ pg encontrándose en el rango dado por la mayoría de los autores.

Su valor aumentó desde el día 0, de manera progresiva, hasta alcanzar su valor medio más alto el día 6 con $27,37 \pm 1,37$ pg, para descender hasta el día 55, momento en el cual alcanza su valor medio más bajo con $17,03 \pm 1,30$ pg (Gráfica 6). Del estudio estadístico se deduce que la recuperación fue efectiva el día 15.

Los días 1 y 3 obtenemos valores elevados erróneamente al ser calculada la HCM indirectamente por la cantidad de hemoglobina, ya que debido a la destrucción eritrocitaria aparece hemoglobinemia, asumiendo el contador hematológico que la hemoglobina libre en el plasma está presente dentro de los eritrocitos, obteniendo así valores falsamente aumentados de HCM.

El valor tan elevado encontrado el día 6 es debido a que la aparición de reticulocitos en la circulación está asociada a un incremento en la HCM ya que los reticulocitos poseen mayor cantidad de hemoglobina que los eritrocitos (Sheeler y Barber, 1965) presentando una correlación directa con el VCM excepto en animales con eritrocitos macrocíticos e hipocrómicos (Meyer y Harvey, 2004).

Administrando una única dosis pero más elevada que en nuestro protocolo, la evolución es similar a la encontrada por nosotros. Así, Berger (1985) emplea una

dosis única de 90 mg/kg intraperitoneal, en ratas Wistar macho de 2 meses de edad obteniendo valores de 21,8; 29,3; 35,7; 33,7 y 25,5 pg los días 0, 1, 3, 7 y 14 respectivamente, observando los datos falsamente elevados los días 1 y 3 debido a la hemoglobinemia.

En el caso de dosis altas y repetidas, la recuperación también es similar a la obtenida por nosotros. Criswell et al. (2000), utilizando una dosis de PHZ de 50 mg/kg intraperitoneal, 3 días consecutivos en ratas macho Wistar de 40 días obtiene un regreso a la normalidad en los valores de la HCM el día 14.

También se han publicado datos de dosis bajas y repetidas de manera crónica con una pauta de elevación de la HCM similar a la nuestra. Así, Redondo et al. (1995) utilizando una dosis diaria de 12,5 mg/kg intraperitoneal, 21 días consecutivos, en ratas Wistar macho de 3 meses de edad y un peso de 325 g, obtuvo valores de 18,24; 22,5; 28,7; 27,6; 25,1; 23,6; 20,23 y 20,23 pg los días 0, 3, 7, 11, 14, 21, 29 y 36 respectivamente comprobando que el día 7 es el momento en el que se aprecia la máxima elevación. Kakiuchi et al. (2006) utilizan una dosis diaria de 3 mg/kg de acetilfenilhidracina, vía oral durante 14 días en ratas macho de 6 semanas obteniendo valores de HCM de 19,1 pg el día 0 y de 27,2 pg el día 14.

En cuanto al ratón, únicamente hemos encontrado datos de HCM en el trabajo de Paul et al. (1999), quienes utilizan una dosis de 25 mg/kg intraperitoneal cada dos días durante 10 semanas en animales de 2 meses de edad; el día 0 comienza con valores de 15,8 pg y el día 70 éstos se elevan a 21,4 pg.

En el caso del conejo, dosis menores a las empleadas por nosotros provocan una pauta similar. Sheeler y Barber (1965) utilizan una dosis intramuscular de 8 mg/kg dos días consecutivos en conejos Nueva Zelanda macho de 2-3 kg. Obtienen valores para la HCM de 20,8; 18,0; 16,8; 20,9; 26,1; 22,5 y 21,0 pg los días 0, 1, 3, 6, 10, 15 y 19 respectivamente.

Analizando los experimentos de los diferentes autores que refieren datos de VCM y HCM después de provocar una anemia hemolítica por oxidación con PHZ comprobamos que el aumento y descenso de VCM y HCM presentan una alta correlación.

4.2.8. CONCENTRACIÓN DE HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MEDIA

Las primeras referencias respecto a este parámetro en jerbos son las aportadas por Zeman (1967), quien describe valores medios para individuos macho de dos meses y medio de edad de $27,1 \pm 4,2$ g/dl y las de Mays (1969) quien publica para machos valores de CHCM entre 30,64 y 33,33 g/dl con un valor medio de $32,14 \pm 0,7$ g/dl.

Posteriormente, Termer y Glomsky (1978) describen valores medios para individuos macho de 7 meses de $33,0 \pm 0,7$ g/dl; Rosa y Glomsky (1981) de $35,0 \pm 0,5$ g/dl y Kim et al. (2006), para machos de 7 semanas de edad, de $32,6 \pm 2,36$ g/dl.

Nuestro grupo de trabajo ha publicado datos para jerbos macho de 6-8 meses de 32,95 g/dl (Cano Rábano et al., 1999) y para jerbos de 6-12 meses de 33,62 g/dl (Cano Rábano et al., 2001).

Al comienzo del protocolo el valor medio de CHCM era de $30,60 \pm 1,66$ g/dl y al finalizar de $28,70 \pm 1,30$ g/dl encontrándose nuestros valores por debajo de la media debido a la utilización de otra estirpe diferente a la de nuestro grupo de investigación.

Después de la administración de PHZ, su valor aumentó desde el día 0 hasta alcanzar su nivel medio más alto el día 3 con $43,70 \pm 15,60$ g/dl; posteriormente descendió hasta el día 55, momento en el cual alcanza su valor medio más bajo con $28,70 \pm 1,30$ g/dl (Gráfica 7). Del estudio estadístico se deduce que la recuperación fue efectiva el día 6.

El día 1 el valor obtenido fue de $40,82 \pm 6,60$ g/dl y el día 3 de $43,70 \pm 15,60$ g/dl. Dado que el límite de solubilidad para la hemoglobina es 37 g/dl este hecho significa que los datos obtenidos están siendo falseados por la presencia de hemoglobina libre en el plasma (Jain, 1993). Esta interferencia se debe a la presencia en sangre de hemólisis, lipemia o cuerpos de Heinz. En el caso de la hemólisis, cierta cantidad de hemoglobina está libre en el plasma, pero la fórmula usada para calcular la CHCM asume que toda la hemoglobina medida está contenida en los eritrocitos. Por otra parte, la lipemia y la presencia de cuerpos de

Heinz provocan turbidez del plasma y el espectrofotómetro lo mide como hemoglobina, resultando ésta falsamente elevada (Meyer y Harvey, 2004). Por lo tanto, es posible la utilización de la HCM y de la CHCM como marcadores de la presencia de hemoglobina libre en el plasma y de la hemólisis intravascular (Jain, 1993).

La aparición de un alto porcentaje de reticulocitos en la circulación está asociada a un incremento en el VCM y la HCM, no obstante, la CHCM disminuye durante la respuesta de los reticulocitos ya que estas células jóvenes no están en posesión de su capacidad total de hemoglobina, es decir, aunque los reticulocitos presentan una cantidad mayor de hemoglobina que los eritrocitos, la CHCM, que representa el peso de la hemoglobina en función del volumen de la célula, es menor ya que el eritrocito adulto está saturado de hemoglobina en condiciones fisiológicas (Sheeler y Barber, 1965) y la síntesis de hemoglobina continúa en los reticulocitos hasta su maduración (Meyer y Harvey, 2004).

En los siguientes experimentos corroboramos este descenso de la CHCM, pero no en nuestro estudio ya que presenta idénticos valores de CHCM el día 0 y el día 10, 30,60 g/dl, siendo el número de reticulocitos de 3 y 40% respectivamente, sugiriendo que los reticulocitos del jerbo presentan una CHCM similar a la de los eritrocitos adultos.

Berger (1985) utiliza una dosis única de 90 mg/kg intraperitoneal, en ratas Wistar macho con 2 meses de edad y obtienen valores de CHCM de 33,9; 50,2; 46,4; 31,2 y 31,6 g/dl los días 0, 1, 3, 7 y 14 respectivamente. Se puede apreciar que los valores del día 1 y del día 3 están falsamente incrementados y el descenso por debajo de los valores normales los días 7 y 14.

En el caso de dosis altas y repetidas la recuperación es más lenta. Así, Criswell et al. (2000), utilizando una dosis de PHZ de 50 mg/kg intraperitoneal, 3 días consecutivos en ratas macho Wistar de 40 días, comienzan con 34 g/dl y alcanzan el valor máximo el día 4 con 50 g/dl, regresando a valores normales el día 14.

En el caso de dosis leves repetidas de manera crónica, Redondo et al. (1995) con una dosis diaria de 12,5 mg/kg intraperitoneal, 21 días consecutivos en ratas Wistar macho de 3 meses de edad obtienen valores de CHCM de 34,06; 39,36;

32,06; 27,20; 28,43; 30,02; 33,6 y 34,46 g/dl los días 0, 3, 7, 11, 14, 21, 29 y 33 respectivamente. Se observa el valor falseado en el día 3 y el descenso a partir del día 11, que no se recupera hasta el día 29. El descenso de la CHCM también se observa en los siguientes protocolos. Así, Pesquero et al. (2000) utilizan una dosis de 12,5 mg/kg durante 8 días en ratas Sprague-Dawley macho de 300-400 g y obtienen valores de CHCM para el día 0 de 33,3 g/dl y de 19,9 g/dl para el día 9. Kakiuchi et al. (2006) utilizaron una dosis de 3 mg/kg de acetilfenilhidracina, vía oral, durante 14 días en ratas macho de 6 semanas y obtuvieron 33,4 g/dl y 26,6 g/dl los días 0 y 14 respectivamente.

En el caso del conejo, con dosis menores, también desciende la CHCM rápidamente y el tiempo de recuperación de los valores normales es más lento. Sheeler et al y Barber (1965) utilizan una dosis intramuscular de 8 mg/kg de PHZ dos días consecutivos en conejos Nueva Zelanda macho de 2-3 kg y obtienen valores de CHCM de 29,9; 25,4; 23,8; 24,2; 27,2 y 26,4 g/dl los días 0, 3, 6, 10, 15 y 19 respectivamente.

4.3. PARÁMETROS BIOQUÍMICOS

Para la determinación de los parámetros bioquímicos se han seguido los métodos de referencia recomendados por la IFCC (International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine), según los cuales la interferencia debida a la hemólisis en las distintas enzimas y metabolitos estudiados se produce de la siguiente manera: la LDH, la ASAT y el hierro aumentan su valor proporcionalmente a la cantidad de hemoglobinemia existente (técnicamente no es una interferencia ya que se encuentran dentro de los eritrocitos de manera fisiológica); la FA, la albúmina y la proteína total, se ven afectadas cuando la hemoglobinemia supera los 2,5 g/l; en el caso de la urea es necesario alcanzar 5 g/l de hemoglobinemia para que exista interferencia y la ALAT, la bilirrubina y la creatinina no se ven afectadas incluso con 10 g/l de hemoglobinemia. Debe tenerse en cuenta esta observación bajo la perspectiva de que, en nuestro caso, la interferencia debida a la hemólisis no es secundaria a una práctica deficiente en la obtención o manipulación de la muestra sino derivada del proceso patológico inducido al que son sometidos los animales objeto de este trabajo.

4.3.1. LACTATO DESHIDROGENASA

Esta enzima cataliza la oxidación de L-lactato a piruvato. Presenta 5 isoenzimas de las cuales la LDH-1 y la LDH-2 son las predominantes en el eritrocito, músculo cardíaco y riñón; la LDH-3 en el pulmón y la LDH-4 y LDH-5 en el hígado y músculo esquelético. Debido a la alta actividad que presenta, una mínima hemólisis o daño tisular puede dar resultado a una elevación de sus valores en la circulación periférica (Meyer y Harvey, 2004).

En medicina humana, Kato et al. (2006) establecen el valor de LDH en plasma como un biomarcador de la hemólisis intravascular y el Colegio Americano de Cardiólogos propone la determinación de LDH en pacientes con prótesis valvulares cardíacas, para evaluar el grado de anemia hemolítica que éstas provocan por daño mecánico en los eritrocitos (Suedkamp et al., 2004).

No se encuentran datos en la bibliografía consultada referente a este parámetro en el jerbo, con el problema añadido de que los encontrados para otros roedores presentan una gran variabilidad entre sí. Así, Melby y Altman (1974) recogen valores dados por diferentes autores para la rata y que oscilan entre 478 ± 300 , 277 ± 36 , 349 ± 147 y 189 ± 103 U/l. Meeks (1989) también recogen valores muy dispares de LDH en la rata, 137 ± 135 , 149 ± 176 , 46 ± 22 , 105 ± 77 , 452 , 301 , 186 ± 12 , 573 ± 94 , 99 ± 9 y 63 ± 7 U/l para animales de edades comprendidas entre 6-7 meses.

En nuestro caso, al comienzo del protocolo el valor medio de LDH fue de $365,90 \pm 230$ U/l y al finalizar de $514,63 \pm 391$ U/l.

Aumentó su valor desde el día 0 bruscamente hasta su valor medio más alto el día 1 con $3.511,20 \pm 588$ U/l, para descender rápidamente el día 3 a $953,50 \pm 523$ U/l, subir de nuevo el día 6 y disminuir el día 10 manteniéndose en esos valores hasta el final (Gráfica 8). Del estudio estadístico se deduce que la recuperación fue efectiva el día 10.

Este es un parámetro que presenta gran variabilidad individual ya que su aumento es proporcional a la resistencia encontrada a la hora de extraer sangre del plexo supraorbitario del jerbo a cada animal.

Naughton et al. (1989) utilizan en ratas una dosis intraperitoneal de 40 mg/kg y posteriormente 20 mg/kg semanalmente durante 6 semanas, describiendo ascensos significativos en la enzima LDH.

4.3.2. BILIRRUBINA TOTAL

Los primeros datos en la bibliografía son los aportados por Illera et al. (1993) quienes publican valores de bilirrubina de 0,53 mg/dl para jerbos macho de 4-5 meses y los del Research Animal Resource de la Universidad de Minnesota (USA) quienes citan un rango de valores normales de bilirrubina total en el jerbo de entre 0,2 y 0,6 mg/dl.

Al comienzo de nuestro protocolo el valor medio fue de $0,60 \pm 0,19$ mg/dl y al finalizar de $0,86 \pm 0,37$ mg/dl por lo que nuestros datos son ligeramente superiores a los referidos por otros autores.

Las causas más comunes del aumento de la bilirrubina en sangre son la hemólisis acelerada de glóbulos rojos o el daño hepático. La hemólisis puede confirmarse si se encuentra una marcada reducción del hematocrito (Meyer y Harvey, 2004).

Debido a que el grupo hemo es muy insoluble, es rápidamente retirado del organismo y metabolizado produciendo bilirrubina no conjugada y hierro. La bilirrubina no conjugada, en altas dosis, tiene múltiples efectos tóxicos como son la inhibición de enzimas deshidrogenasas y de las involucradas en el transporte de electrones, la unión de membranas celulares por disminución de la actividad de la Na-K-ATPasa y la reducción de la actividad de la glutatión-S-transferasa (Everse y Hsia, 1997).

Aumentó su valor desde el día 0 hasta su valor medio más alto el día 3 con $3,84 \pm 3,88$ mg/dl, para descender el día 10 a valores normales de $0,76 \pm 0,19$ mg/dl y mantenerse hasta la finalización del protocolo (Gráfica 10). Del estudio estadístico se deduce que la recuperación fue efectiva el día 6.

El análisis de los protocolos de inducción de anemia hemolítica encontrados en la literatura no nos permite llegar a ninguna conclusión clara respecto a este parámetro. Maines y Veltman (1984) utilizando una única dosis de 100 mg/kg subcutánea, en ratas macho Sprague-Dawley de 180-200 g, obtienen el día 0

valores de bilirrubina total de 0,4 mg/dl y el día 1 de 7,8 mg/dl. Rokushima et al. (2007) comparando una única dosis de 80 mg/kg con una dosis de 20 mg/kg aplicada 4 días consecutivos intraperitoneal en ratas Sprague-Dawley hembras de 4 semanas de edad, encuentran valores para la dosis de 80 mg/kg de 0,04 mg/dl el día 0 y de 0,2 mg/dl el día 1, mientras que para la dosis de 20 mg/kg el día 1 obtienen cifras de 0,09 mg/dl y el día 4 de 0,55 mg/dl. Aún utilizando dosis similares en la misma estirpe de rata los valores de bilirrubina citados son muy dispares.

En dosis aplicadas en animales jóvenes tampoco llegamos a encontrar similitudes. Rice et al. (2008) utilizan una única dosis de 75 mg/kg intraperitoneal en ratas de 15 días y la bilirrubina total alcanza 30 mg/dl en 48-72 horas. Mejía et al. (2008) obtienen cifras de $1,44 \pm 0,5$ mg/dl el día 0 y de $5,04 \pm 1,86$ mg/dl el día 3 aplicando una dosis de 75 mg/kg intraperitoneal durante 2 días, en ratas Wistar de 7 días de edad sacrificadas el día 3.

En cuanto a dosis aplicadas de manera crónica, Kakiuchi et al. (2006) utilizan una dosis diaria de 3 mg/kg de acetilfenilhidracina vía oral durante 14 días en ratas macho de 6 semanas obteniendo valores de 0,03 mg/dl el día 0 y 0,25 mg/dl el día 14.

4.3.3 HIERRO

Los datos encontrados en la bibliografía son los aportados por Otto-Duessel et al. (2007) que describen valores para el hierro en jerbos hembra de 18-20 semanas de 250 ± 54 µg/dl y los de Yang et al. (2003) de 311 ± 25 µg/dl para hembras de 20-28 semanas.

Al comienzo de nuestro protocolo el valor medio fue de 270 ± 46 µg/dl y al finalizar de 193 ± 46 µg/dl. Nos encontramos, por tanto, dentro los valores anteriormente descritos al principio de nuestro experimento pero por debajo al final del mismo.

La hemólisis intra y extravascular está asociada a incrementos de hierro en el plasma debido a la destrucción de los eritrocitos, siendo transportado por proteínas para su reutilización o almacenamiento (Stockham et al., 2002).

Además, el hierro libre en el plasma procedente de la hemólisis intravascular es capaz de inducir reacciones oxidativas como la peroxidación lipídica y la oxidación de proteínas en la membrana celular (Ferrali et al., 1997), debido principalmente a la generación de radicales hidroxilo al reaccionar con el peróxido de hidrógeno (Everse y Hsia, 1997).

En nuestro estudio aumentó su valor desde el día 0 bruscamente hasta su valor medio más alto el día 1 con $541,27 \pm 78 \mu\text{g/dl}$, para descender rápidamente el día 3 a $251,19 \pm 80 \mu\text{g/dl}$, volver a subir el día 6 a $348,91 \pm 88 \mu\text{g/dl}$ y los días 10 y 15 sufrir un descenso pronunciado, por debajo de valores normales, $179,06 \pm 58$ y $142,19 \pm 57 \mu\text{g/dl}$ respectivamente, para posteriormente mantenerse en valores bajos, pero sin llegar a encontrar diferencias significativas, hasta el final del experimento (Gráfica 11).

A la vista de los datos observamos que los días 10 y 15 los valores de hierro caen por debajo de los de referencia de manera significativa, debido a la intensidad en la formación de reticulocitos, que el día 10 alcanza el máximo con 40%, encontrándonos con una deficiencia de hierro como puede corroborarse al observar los eritrocitos de las extensiones sanguíneas realizadas esos días. El día 21 se produce la recuperación significativa de ese déficit.

Lo expuesto anteriormente concuerda con los resultados obtenidos por Burkhard et al. (2001), quienes empleando una única dosis de 50 mg/kg intraperitoneal en ratas Sprague-Dawley encuentran valores de 240, 440, 420 y 110 $\mu\text{g/dl}$ los días 0, 1, 4 y 8 respectivamente. En este último se observa, al igual que en nuestro protocolo, una elevación de los valores de hierro en los primeros días, provocada por la hemólisis seguida de una posterior carencia de hierro en el momento de mayor regeneración de glóbulos rojos.

La administración de dosis leves y crónicas mantiene elevado el hierro sérico según el estudio de Kakiuchi et al. (2006), quienes utilizan una dosis diaria de 3 mg/kg de acetilfenilhidracina, vía oral durante 14 días, en ratas macho de 6 semanas, obteniendo valores de 156 ± 27 y $341 \pm 97 \mu\text{g/dl}$ los días 0 y 14 del experimento.

Como en anteriores parámetros el conejo es particularmente sensible a la acción oxidante. Sheeler y Barber (1965) utilizan una dosis intramuscular de PHZ de 8

mg/kg, dos días consecutivos en conejos Nueva Zelanda macho de 2-3 kg y obtienen valores de 150, 214 y 336 $\mu\text{g/dl}$ los días 0, 1 y 2 respectivamente.

4.3.4. ALANINA AMINOTRANSFERASA

Esta enzima se encuentra en una alta concentración en el hígado, aunque también ha sido demostrada su actividad en tejidos como el intestino, riñón, corazón y músculo de la rata y el ratón. La actividad es de 3 a 10 veces más alta en el hígado que en otros tejidos tanto en la rata (Quimby, 1989), como en el ratón (Meeks, 1989).

Los datos que se encuentran en la literatura son muy recientes pero también muy variables incluso en animales de edad similar. Yang et al. (2003) describen valores para jerbos hembra de 5-7 meses de $67,2 \pm 10$ U/l; en cambio, Otto-Duessel et al. (2007) publican valores para ALAT en jerbos hembra de 5 meses de $112,8 \pm 48,2$ U/l y Bitri et al. (2007) citan valores de ALAT para jerbos macho de $52,66 \pm 8,29$ U/l en animales de entre 69 y 90 g. En el caso de animales jóvenes Kim y Lee (2006) describen valores de ALAT para jerbo macho de 7 semanas de edad de $40,5 \pm 2,51$ U/l.

Al comienzo del protocolo el valor medio en nuestros jerbos fue de $97,24 \pm 49,56$ U/l y al finalizar de $85,90 \pm 12,10$ U/l, de tal manera que nuestros datos se encuentran por encima de la mayoría dados por los autores referidos.

Al provocar la anemia hemolítica, los valores aumentaron bruscamente el día 1 con 398 ± 87 U/l, para descender el día 3 hasta $331,12 \pm 72$ U/l y continuar su descenso hasta su recuperación el día 10 con $78,00 \pm 17$ U/l, manteniéndose en esos valores hasta el final (Gráfica 12). Del estudio estadístico se deduce que la recuperación fue efectiva el día 10.

Furuhama et al. (1987) publican aumentos de ALAT y los asocian a necrosis en los hepatocitos de ratas tratadas con PHZ. Al hacer la necropsia a nuestros jerbos encontramos el hígado aumentado de tamaño e inflamado provocando los aumentos de ALAT.

Naughton et al. (1989) utilizan una dosis intraperitoneal inicial de 40 mg/kg y posteriormente una dosis de 20 mg/kg cada 7 días, durante 6 semanas en ratas macho Long-Evans de 165-235 g, encontrando 38 U/l el día 0, 56 U/l el día 7, 42 U/l el día 14, 45 U/l el día 21, 37 U/l el día 28, 45 U/l el día 35 y 43 U/l el día 42. Al tratarse de una dosis baja y espaciada en el tiempo no podemos establecer comparaciones con nuestro experimento.

4.3.5. ASPARTATO AMINOTRANSFERASA

Los tejidos que presentan una alta actividad de la ASAT son el hígado, el músculo estriado, el músculo cardiaco (Meyer y Harvey, 2004) y los glóbulos rojos (Hoffman et al., 1989). También puede ser detectada su actividad en riñón, cerebro, pulmón, testículos e intestino pero la mayor actividad se encuentra en el músculo cardiaco de la rata (Quimby, 1989) y el ratón (Meeks, 1989).

La actividad enzimática de la ASAT en la rata se puede cuantificar como 88 U/g en hígado, 269 U/g en corazón, 69 U/g en músculo, 57 U/g en riñón, 25 U/g en intestino (Boyd, 1983) y, en medicina humana la actividad dentro de los eritrocitos se puede cuantificar como $3,02 \pm 0,67$ U/g de hemoglobina (Harvey, 1997).

Debido a la alta actividad que presenta en los eritrocitos la hemólisis puede dar resultado a una elevación en la circulación (Meyer y Harvey, 2004).

Los datos obtenidos en la bibliografía científica nos aportan datos recientes pero dispares. Así, Yang et al. (2003) describen valores para jerbos hembra de 5-7 meses de 182 ± 21 U/l, en cambio Otto-Duessel et al. (2007) citan para jerbos hembra de 5 meses, 458 ± 130 U/l. En cuanto a animales jóvenes los datos reportados por Kim et al. (2006) para jerbos macho, con edad de 7 semanas, son de 165 ± 7 U/l y Bitri et al. (2007) publican valores de ASAT para jerbos hembra de 245 ± 18 U/l en animales de entre 69 y 90 g.

Al comienzo del protocolo el valor medio era de $199,48 \pm 64$ U/l y al finalizar de $251,90 \pm 30$ U/l, de tal forma que nuestros datos, son más acordes a los publicados por Yang et al. (2003).

En nuestro estudio aumentó su valor desde el día 0, alcanzando su nivel medio más alto el día 1 con $564,68 \pm 127$ U/l, manteniéndose en esos valores hasta descender

el día 10 a $188,93 \pm 27$ U/l y continuar en cifras normales hasta el final del protocolo (Gráfica 13). Del estudio estadístico se deduce que la recuperación fue efectiva el día 10.

Naughton et al. (1989) utilizan una dosis intraperitoneal inicial de 40 mg/kg y seguidamente una dosis de 20 mg/kg, cada 7 días durante 6 semanas, en ratas macho Long-Evans de 165-235 g obteniendo el día 0, 42; día 7, 120; día 14, 150; día 21, 145; día 28, 85; día 35, 105 y día 42 110 U/l. El efecto en el día 7 antes de la segunda inyección es similar a nuestro caso con una elevación prácticamente idéntica, a pesar de haber empleado una menor dosis.

4.3.6. FOSFATASA ALCALINA

La actividad de esta enzima se encuentra principalmente en hígado, riñón, intestino y hueso (Meyer y Harvey, 2004). En la rata se puede valorar como 1,17 U/g de hígado, 0,5 U/g de músculo, 300 U/g de riñón (Boyd, 1983).

Los valores normales descritos por Laber-Laird (1996) son de 12-37 U/l pero sin especificar el método empleado; de esta manera, la cuantificación de la enzima puede ser muy diferente según la metodología utilizada (Harvey, 1997). Cano et al. (2001) publican un rango de valores de 106-557 U/l en un estudio con jerbos de entre 2,5 y 11 meses con un valor medio de 218 U/l.

Al comienzo de nuestro protocolo los valores fueron de $89,44 \pm 11$ U/l y al finalizar de $72,80 \pm 7$ U/l. Por lo tanto nuestros valores son más bajos que los descritos anteriormente, debido a la utilización de una estirpe diferente a la de nuestro grupo de investigación.

Desde el día 1 se produjo un descenso de su valor hasta alcanzar el nivel más bajo el día 6 con $42,50 \pm 10$ U/l, para aumentar progresivamente hasta el valor medio más alto el día 45 con $88,70 \pm 3$ U/l (Gráfica 14). Del estudio estadístico se deduce que la recuperación fue efectiva el día 36.

La FA en plasma se ve disminuida por la hemólisis (Meyer y Harvey, 2004). Según la información suministrada por Roche para el autoanalizador Cobas Integra 400, la hemólisis produce resultados falsamente reducidos, que pueden llegar a un 20%

menos con la existencia de 3 g/l de hemoglobinemia. Esto explicaría el descenso los primeros días cuando está presente la hemoglobinemia, pero no los días posteriores que continúa por debajo de valores normales hasta el día 36.

Tampoco coincidimos con Naughton et al. (1989) quienes describen un aumento de la FA, utilizando una dosis intraperitoneal inicial de 40 mg/kg y posteriormente una dosis de 20 mg/kg, cada 7 días durante 6 semanas, en ratas macho Long-Evans de 165-235 g, obteniendo el día 0 160 U/l, el día 7 235 U/l, el día 14 240, el día 21 190 U/l, el día 28 170 U/l, el día 35 155 U/l y el día 42 145 U/l.

4.3.7. UREA

La urea se forma por enzimas hepáticas a partir del amonio producido por el metabolismo proteico, por lo que un aumento en el catabolismo proteico puede incrementar su formación. Un incremento en la circulación es generalmente debido a causas prerrenales consecuencia de descenso de la ratio de filtración glomerular, a causas renales por daño en el glomérulo, o postrenales secundarias a obstrucciones en el tracto urinario (Meyer y Harvey, 2004).

Aunque la urea se ha venido empleando clásicamente para valorar la función renal, está influenciada por la dieta, la función hepática, la absorción gastrointestinal de nitrógeno y el estado de hidratación (Quimby, 1989).

Cano Rábano et al. (2001) describen el rango normal de urea entre 37,5 y 77,5 mg/dl en jerbos de entre 2,5 y 11 meses. Estos datos también concuerdan con los descritos por Mays (1969) de 16,8-31,3 mg/dl de BUN; siendo el BUN el 47% del valor de la urea, la conversión da valores de 35,74-66,59 mg/dl. Posteriormente, Gallego Morales et al. (2004) citan valores para jerbos macho de 4 meses de 41,39 mg/dl. Los datos recogidos en la literatura para animales jóvenes, por Kim et al. (2006) para jerbos macho con edad de 7 semanas son de 50,64 mg/dl.

Al comienzo de nuestro protocolo el valor medio fue de $40,56 \pm 8,95$ mg/dl y al finalizar de $42,20 \pm 7,98$ mg/dl. Así, nuestros valores son prácticamente idénticos a los descritos por Gallego Morales et al. (2004).

El valor medio más bajo se alcanzó el día 1 con $28,00 \pm 4,69$ mg/dl, y el valor medio más alto el día 3 con $47,04 \pm 11,39$ mg/dl (Gráfica 15). A pesar de la

diferencia de valores entre los distintos días de muestreo, el estudio estadístico no encuentra diferencias estadísticamente significativas entre las tomas.

Unami et al. (1996) utilizan una dosis diaria de 10 mg/kg vía oral en ratas, durante una semana, destacando que su efecto en el BUN es mínimo y no llega a ser significativo.

4.3.8. CREATININA

Es el producto irreversible del metabolismo de la creatina en el músculo. En general, la valoración de este parámetro es considerada más útil que la de la urea ya que se ve menos influenciada por factores extrarrenales (únicamente por la dieta y el balance de nitrógeno) y es considerado más sensible (Ragan, 1989).

Un incremento en la circulación es generalmente debido a causas prerrenales como un descenso de la ratio de filtración glomerular o causas renales debido a daño en el glomérulo (Meyer y Harvey, 2004).

Los primeros datos fueron publicados por Mays (1969) quien cita en jerbos valores de entre 0,5 y 1,4 mg/dl con un valor medio de $0,88 \pm 0,2$ mg/dl. Estos datos son elevados si comparamos con publicaciones posteriores como la de Wasan et al. (2001) que citan valores medios de $0,49 \pm 0,13$ mg/dl o Illera et al. (1993) de 0,56 mg/dl para jerbos de 4-5 meses.

Posteriormente, nuestro grupo de trabajo ha publicado valores medios de $0,59 \pm 0,09$ mg/dl (Cano Rábano et al., 1999), valores de entre 0,37 y 0,84 mg/dl para jerbos de 2,5-11 meses (Cano Rábano et al., 2001) y valores para jerbos macho de 4 meses de 0,45 mg/dl (Gallego Morales et al., 2004). En jerbos jóvenes, Kim et al. (2006) citan valores de creatinina para jerbos macho con edad de 7 semanas de $0,98 \pm 0,24$ mg/dl.

Al comienzo del protocolo el valor medio era de $0,41 \pm 0,03$ mg/dl y al finalizar $0,41 \pm 0,04$ mg/dl encontrándose por debajo de los valores referidos por los autores anteriores debido a que hemos empleado una estirpe diferente a la de nuestro grupo de investigación.

A lo largo del experimento aumentó su valor desde el día 0 hasta su valor medio más alto el día 1 con $0,59 \pm 0,04$ mg/dl, para descender progresivamente hasta el día 10 con $0,39 \pm 0,01$ manteniéndose en esos valores hasta el final del protocolo (Gráfica 16). Del estudio estadístico se deduce que la recuperación fue efectiva el día 10.

Jain (1993) señala la posibilidad de nefrosis debido a la hemoglobinuria, la cual comprobamos únicamente el día 1 mediante la observación de la orina. Si la hemólisis intravascular es importante puede aparecer toxicidad tubular renal debida al pigmento hemo y dar lugar a insuficiencia renal aguda (IRA) por la obstrucción intratubular por cilindros pigmentados (pigmentos hemo precipitados), la toxicidad tubular mediada por el hierro quelado libre, la vasoconstricción renal debida a la inhibición del efecto vasodilatador del óxido nítrico y la depleción concomitante de la volemia (Hermida Vergara et al., 2006). La vasoconstricción renal provocada por la hemoglobina libre en el plasma, reduce la biodisponibilidad de óxido nítrico provocando disfunción endotelial, contribuyendo a hipertensión pulmonar y vasoconstricción general, de forma que disminuye la tasa de filtración glomerular (Ballas y Marcolina, 2006). Éste es el mayor mecanismo de daño renal agudo durante la hemólisis, mayor aún que la precipitación de hemoglobina en el riñón y la peroxidación lipídica de las células renales (Lim et al., 2000).

Tam y Wong (1988) infunden hemoglobina en ratas para investigar su efecto en la función tubular renal. Durante la infusión se redujo en un 30% la tasa de filtración glomerular y la ratio de la excreción de sodio aumentó, sugiriendo daño en los túbulos proximales.

Unami et al. (1996) utilizan una dosis diaria de 10 mg/kg vía oral en ratas durante una semana, describiendo que su efecto en la creatinina es mínimo y no llega a ser significativo debido a que la dosis empleada no es suficiente para desencadenar los efectos adversos en el riñón.

4.3.9. PROTEÍNA TOTAL

Los primeros datos aparecidos en la bibliografía son los aportados por Mays en 1969, dando valores medios de 7,90 g/dl. Posteriormente nuestro grupo de trabajo publicó valores de 6,01-7,87 g/dl (Cano et al., 2001) para animales con edades comprendidas entre los 2,5 y los 11 meses. En animales jóvenes Kim et al. (2006)

citan valores de proteína total para jerbos macho, con edad de 7 semanas, de $5,62 \pm 0,53$ g/dl.

Al comienzo del protocolo el valor medio era de $4,92 \pm 0,31$ g/dl y al finalizar de $5,24 \pm 0,47$ g/dl. Este valor es inferior al referido por los autores anteriores debido a que hemos empleado una estirpe diferente.

El valor medio más bajo se alcanzó el día 21 con $4,47 \pm 0,65$ g/dl, aumentando progresivamente hasta su valor medio más alto el día 55 con $5,24 \pm 0,47$ g/dl (Gráfica 17). El estudio no encuentra diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes tomas.

Paul et al. (1999) utilizan una dosis de 25 mg/kg intraperitoneal cada dos días durante 10 semanas, en ratones de 2 meses de edad. El día 0 comienza con 4,58 g/dl y el día 70 presenta 4,69 g/dl, no encontrando tampoco diferencias significativas.

Pesquero et al. (2000) emplean una dosis de 12,5 mg/kg durante 8 días en ratas Sprague-Dawley macho de 300-400 g, comenzando el día 0 con 6,1 g/dl y presentando el día 9 6,0 g/dl, no encontrado tampoco diferencias significativas.

4.3.10. ALBÚMINA

Los valores encontrados en la bibliografía son los citados por Mays (1969) quien sitúa el rango de variación de los valores basales de albúmina sérica entre 1,8 y 5,8, con valores medios de 3,08 g/dl. En jerbos macho de 7 semanas de edad, Kim et al. (2006) citan valores de albúmina de $4,59 \pm 1,55$ g/dl.

Los valores de albúmina oscilaron entre $2,16 \pm 0,21$ g/dl al comienzo del protocolo y $2,51 \pm 0,34$ g/dl al final, encontrándose nuestros valores en el límite inferior del rango de variación aportado por Mays (1969).

En el experimento la albúmina fue descendiendo desde el día 1 hasta el valor medio más bajo que se alcanzó el día 10 con $1,67 \pm 0,23$ g/dl, seguido de una progresiva recuperación hasta alcanzar el valor medio más alto el día 55 con $2,51 \pm 0,34$ g/dl (Gráfica 18). A pesar de la diferencia de valores entre los diferentes días de

muestreo, el estudio no muestra diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes tomas.

Paul et al. (1999) utilizan una dosis de 25 mg/kg intraperitoneal cada dos días durante 10 semanas en ratones de 2 meses de edad. El día 0 comienzan con valores de 2,01 g/dl y el día 70 presentan 2,04 g/dl, no encontrando tampoco diferencias significativas.

En cambio Pesquero et al. (2000) con una dosis de 12,5 mg/kg durante 8 días en ratas Sprague-Dawley macho de 300-400 g, comienzan el día 0 con 4,3 g/dl y finalizan el día 9 con 5,5 g/dl. Estos autores sí encuentran diferencias significativas ($p < 0,05$). Dicho aumento puede ser debido a una interferencia con la hemoglobinemia o la hiperbilirrubinemia (Meyer y Harvey, 2004).

Conclusiones

-
1. La fenilhidrazina, un agente oxidante que ha sido utilizado para la inducción de anemia hemolítica en diferentes especies animales, es capaz de provocar este mismo signo clínico en el jerbo de Mongolia (*Meriones unguiculatus*).
 2. Tras administrar por vía intraperitoneal una dosis única de 60 mg/kg de fenilhidrazina, en el jerbo se desarrolla una anemia suficientemente aguda como para permitir estudios experimentales, sin que la vida de los animales se encuentre comprometida.
 3. La anemia inducida es fuertemente regenerativa, presenta un grado de anisocitosis muy severo y se traduce en modificaciones de diferentes parámetros hematológicos y bioquímicos, que se instauran y retornan a la normalidad a diferentes ritmos.
 4. Entre los parámetros de bioquímica sanguínea estudiados, algunos no se ven afectados (como la proteína total, la albúmina y la urea), otros retornan a la normalidad en los primeros diez días (como la bilirrubina total, la lactato deshidrogenasa, las dos transaminasas y la creatinina) y otros exigen periodos más largos (como el hierro y la fosfatasa alcalina).
 5. Casi todos los parámetros hematológicos tardan más de diez días en volver a la normalidad (la hemoglobina y el hematocrito lo hacen a los quince días y los eritrocitos a los veintiocho) y algunos, como el volumen corpuscular medio o el ancho de distribución de los glóbulos rojos, solo lo consiguen al final del periodo de estudio.
 6. El jerbo de Mongolia (*Meriones unguiculatus*) es un buen biomodelo para el estudio de la anemia hemolítica por oxidación.

Resumen

El jerbo (*Meriones unguiculatus*) es un roedor utilizado recientemente en el campo de la experimentación animal. Entre las peculiaridades que han posibilitado la utilización de esta especie como biomodelo experimental se encuentra su eritropoyesis intensa, con una vida media eritrocitaria muy corta en comparación con el resto de especies utilizadas en experimentación, lo que nos permite llevar a cabo el proceso de anemización y recuperación en un corto espacio de tiempo. Ello convierte al jerbo en un modelo interesante para diferentes protocolos de investigación de la anemia.

En este estudio se ha pretendido valorar la idoneidad del jerbo como biomodelo de anemia por oxidación, utilizando para ello como oxidante una dosis de 60 mg/kg de fenilhidracina, sustancia ampliamente utilizada para provocar tanto anemias agudas como crónicas. Además, dada que no existen demasiadas referencias sobre los valores normales en esta especie, pretendemos aportar datos sobre los parámetros hematológicos y bioquímicos.

Se utilizaron 20 jerbos macho, con una edad comprendida entre 6 y 7 meses de edad y un peso medio de alrededor de 75 g. Los animales fueron mantenidos en condiciones experimentales convencionales con temperatura (20-22°C), humedad (45-60%), renovación de aire (15-20 veces/hora) y ciclo luz-oscuridad (12:12 horas) controlados. Se proporcionó una dieta comercial para roedores y agua de bebida *ad libitum*.

Para inducir la anemia hemolítica se administró una única dosis de clorhidrato de fenilhidracina, a dosis de 60 mg/kg, por vía intraperitoneal. Los jerbos fueron divididos en 4 grupos de cinco animales cada uno, para poder realizar los muestreos de sangre de manera alterna y no incrementar de manera iatrogénica la anemia de los animales. Los muestreos se efectuaron los días 0, 1, 3, 6, 10, 15, 21, 28, 36, 45 y 55, mediante punción del seno venoso retroorbitario.

Las muestras de sangre fueron analizadas inmediatamente después de su extracción en un contador hematológico semiautomático, obteniendo los valores de recuento de glóbulos rojos, hemoglobina, hematocrito y ancho de distribución de los eritrocitos, así como los índices eritrocitarios (volumen corpuscular medio, hemoglobina corpuscular media y concentración de hemoglobina corpuscular media). El examen del frotis sanguíneo y el recuento de reticulocitos se efectuaron

de manera manual. Utilizando un autoanalizador bioquímico se valoraron en plasma la lactato deshidrogenasa, la bilirrubina total, el hierro, la alanino aminotransferasa, la aspartato aminotransferasa, la fosfatasa alcalina, la urea, la creatinina, las proteínas totales y la albúmina.

La anemia observada en el jerbo tras la administración de fenilhidrazina puede ser calificada como fuertemente regenerativa y con un elevado grado de anisocitosis.

El recuento de glóbulos rojos, el hematocrito y la hemoglobina alcanzaron los valores más bajos el día 3 ($2,30 \pm 0,60 \times 10^6/\mu\text{l}$, $11,94 \pm 3,00\%$ y $5,12 \pm 1,84$ g/dl, respectivamente) y la recuperación se produjo los días 28 ($7,27 \pm 0,58 \times 10^6/\mu\text{l}$) y 15 ($46,80 \pm 3,60\%$ y $13,63 \pm 0,50$ g/dl respectivamente). Los otros parámetros hematológicos mostraron ritmos evolutivos diferentes con incrementos o disminuciones en momentos distintos y retorno a la normalidad en días diferentes. Los reticulocitos llegaron al máximo (40%) el día 10, para normalizarse el día 28 (3%). El aumento del volumen corpuscular medio y del ancho de distribución de los eritrocitos alcanzó el máximo el día 10 ($84,68 \pm 2,80$ fl y $56,57 \pm 3,10\%$, respectivamente) y su recuperación fue efectiva el día 55 ($59,40 \pm 1,28$ fl y $30,23 \pm 1,02\%$, respectivamente). El valor más elevado de la hemoglobina corpuscular media se observó el día 6, con $27,37 \pm 1,75$ pg, regresando a valores normales el día 15, con $21,45 \pm 1,76$ pg. La concentración de hemoglobina corpuscular media alcanzó el valor más elevado el día 3 ($43,70 \pm 15,60$ g/dl) para retornar a valores normales el día 10 ($30,60 \pm 0,40$ g/dl).

Entre los parámetros plasmáticos, la proteína total, la albúmina y la urea no se vieron afectados por la anemia. Los otros parámetros, excepto la fosfatasa alcalina que disminuye, experimentaron incrementos que llegaron a sus valores máximos el día 1 (hierro, lactato deshidrogenasa, las dos transaminasas y creatinina) o el día 3 (bilirrubina total). El retorno a la normalidad se produjo a ritmos diferentes, pero antes del día 10 en todos los parámetros menos en el caso del hierro (que lo hizo a los 21 días).

A la vista de estos resultados, el jerbo se presenta con un buen modelo para el estudio de la anemia por oxidantes.

Summary

The gerbil (*Meriones unguiculatus*) is a rodent that has been used recently for animal experimentation. Among the characteristics that have made this species as a possible experimental biomodel we can note its intense erythropoiesis, with a very short half-life of erythrocytes, which compared with other species used in experimentation allows us to carry out the process of anemia and recovery in a short span of time. This makes the gerbil an interesting model for different anemia research protocols.

This study intends to assess the gerbil as an oxidative anemia biomodel, using as oxidant a dose of 60 mg/kg of phenylhydrazine, a substance widely used to cause both acute and chronic anemia. Another objective of the study is to provide data on hematological and biochemical parameters due to the lack of such information in this species in the experimental literature.

We have used 20 male gerbils, between 6 and 7 months old and an average weight around 75 g. The animals were kept under conventional experimental conditions with temperature (20-22°C), humidity (45-60%), replacement of air (15-20 times/hour) and light-dark cycle (12:12 hours) controlled. A commercial rodent diet and drinking water *ad libitum* were provided.

To induce hemolytic anemia, they were given a single dose of phenylhydrazine hydrochloride at a dose of 60 mg/kg, intraperitoneally. The gerbils were divided into 4 groups of 5 animals each, and blood sampling was done alternately in order to not increase iatrogenic anemia in the animals. The samples were taken on days 0, 1, 3, 6, 10, 15, 21, 28, 36, 45 and 55 by retro-orbital venous sinus puncture.

Blood samples were analyzed immediately after extraction in a semi-automatic hematology counter, obtaining values of red blood cell count, hemoglobin, hematocrit and wide distribution of erythrocytes and erythrocyte indices (mean corpuscular volume, mean corpuscular hemoglobin and mean corpuscular hemoglobin concentration). Examination of blood smear and reticulocyte counts were performed manually. Using a biochemical autoanalyzer plasma was evaluated for lactate dehydrogenase, total bilirubin, iron, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, alkaline phosphatase, urea, creatinine, total protein and albumin.

The anemia observed in the gerbils after the administration of phenylhydrazine can be described as highly regenerative and with a high degree of anisocytosis.

The decrease in red blood cell count, hematocrit and hemoglobin was highest on day 3 ($2.30 \pm 0.60 \times 10^6/\mu\text{l}$, $11.94 \pm 3.00\%$ and $5.12 \pm 1.84 \text{ g/dl}$, respectively) and recovery occurred on day 28 ($7.27 \pm 0.58 \times 10^6/\mu\text{l}$) and day 15 ($46.80 \pm 3.60\%$ and $13.63 \pm 0.50 \text{ g/dl}$) respectively. The other hematological parameters showed different evolutionary rates with increases or decreases at different times and a return to normal on different days. Reticulocytes peaked (40%) on day 10, and normalized on day 28 (3%). The increase of the mean corpuscular volume and the wide distribution of erythrocytes reached its peak on day 10 ($84.68 \pm 2.80 \text{ fl}$ and $56.57 \pm 3.10\%$, respectively) and recovery occurred on day 55 ($559.40 \pm 1.28 \text{ fl}$ and $30.23 \pm 1.02\%$, respectively). The mean corpuscular hemoglobin increase was highest on day 6, with $27.37 \pm 1.75 \text{ pg}$, returning to normal values on day 15 with $21.45 \pm 1.76 \text{ pg}$. The mean corpuscular hemoglobin concentration reached the highest value on day 3 ($43.70 \pm 15.60 \text{ g/dl}$) and returned to normal on day 10 ($30.60 \pm 0.40 \text{ g/dl}$).

Among plasma parameters, total protein, albumin and urea were not affected by anemia. The other parameters, except the alkaline phosphatase that decreased, showed increases that reached their peak on day 1 (iron, lactate dehydrogenase, the two transaminases and creatinine) or day 3 (total bilirubin). The return to normal values occurred at different rates, and was achieved by day 10 in all parameters except in the case of iron (occurring at day 21).

In view of these results, the gerbil is presented as a good model for the study of oxidative anemia.

Bibliografía

AALAS (American Association for laboratory Animal Science). Reference Directory 2000. En URL: <http://www.nap.edu.readingroom/books/labrats/chaps.html>

Ades IZ, Cascarano J. Mitochondrial alterations in heart, kidney and liver of rats subjected to anemic hypoxia. *Exp Mol Pathol*. 1979, 30(1):94-109.

Ajioka RS, Levy JE, Andrews NC, Kushner JP. Regulation of iron absorption in Hfe mutant mice. *Blood*. 2002, 100(4):1465-1469.

Amer J, Goldfarb A, Fibach E. Flow cytometric analysis of the oxidative status of normal and thalassemic red blood cells. *Cytometry*. 2004, 60A:73-80.

Andersen DB, Holub BJ. Effects of dietary cholesterol level and type of dietary carbohydrate on hepatic and plasma sterols in the gerbil. *Can J Physiol Pharmacol*. 1982, 60(7):885-892.

Andresen H, Regueira HT y Leighton F. Estrés oxidativo en el paciente crítico. *Rev. méd. Chile*. 2006, 134(5):649-656.

Arce Hernández AA, Villaescusa Blanco R. Organización de la membrana celular: banda 3, estructura y función. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter*. 2005, 21(3). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02892005000300001&lng=es&nrm=iso.

Arkin A, Saito TR, Takahashi K, Amao H. Marking behavior is innate and not learned in the Mongolian gerbil. *Exp Anim*. 2000, 49(3):205-209.

Arkin A, Saito TR, Takahashi K, Sugiyama M, Aokikomori S, Amao H, Takahashi KW. Observation of marking-like behavior, marking behavior, and growth of the scent gland in young Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*) of an inbred strain. *Exp Anim*. 1999, 48(4):269-276.

Arkin A, Saito TR, Takahashi K, Amao H, Aokikomori S, Takahashi KW. Age-related changes on marking, marking-like behavior and the scent gland in adult Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Exp Anim*. 2003, 52 (1):17-24.

Arrington LR, Ammerman CB. Water requirements of gerbils. *Lab Anim Care*. 1969, 19(4):503-505.

Arrington LR, Beaty TC, Kelley KC. Growth, longevity and reproductive life of the Mongolian gerbil. *Lab Anim Sci*. 1973, 23(2):262-265.

Baker AG, Emerson VF. Grating acuity of the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Behav Brain Res*. 1983, 8(2):195-209.

Ballas SK, Marcolina MJ. Hyperhemolysis during the evolution of uncomplicated acute painful episodes in patients with sickle cell anemia. *Transfusion*. 2006, 46(1):105-10.

Baerlocher GM, Schlappritz E, Straub PW, Reinhart WH. Erythrocyte deformability has no influence on the rate of erythrophagocytosis in vitro by autologous human monocytes/macrophages. *Br J Haematol*. 1994, 86(3):629-34.

Barfield MA, Beeman EA. The oestrus cycle in the Mongolian gerbil, *Meriones unguiculatus*. *J Reprod Fertil*. 1968, 17(2):247-251.

Benestad HB, Iversen JG. Haemorrhagic and haemolytic anaemias in the rabbit: a clinically relevant laboratory project in physiology. *Med Educ*. 1983, 17(3):186-92.

Berger J. Screening of toxic-haemolytic anaemia in laboratory rats: a model of phenylhydrazine induced haemolysis. *Haematologia*. 1985, 18:193-200.

Berger J. Age-related sensitivity of rats to induction of anaemia. *Folia Haematol*. 1987, 114:408-413.

Bertorelli R, Adami M, Ongini E. The Mongolian gerbil in experimental epilepsy. *Ital J Neurol Sci*. 1995, 16(1-2):101-106.

Bingel SA. Pathologic findings in an aging Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) colony. *Lab Anim Sci*. 1995, 45(5):597-600.

Bitri L, Dhaouadi N, Ouertani L, Maurel D, Ben Saad M. Toxicity of hexachlorobenzene in *Meriones unguiculatus*: effects on thyroid and liver. CR Biol. 2007, 330(5):410-418.

Boice R, Witter JA. Water deprivation and activity in *Dipodomys ordii* and *Meriones unguiculatus*. J Mammal. 1970,51:615-618.

Boquist L, Fahraeus B. The parathyroid glands of the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). Pathol Eur. 1975,10:134-35.

Boyd JW. The mechanisms relating to increases in plasma enzymes and isoenzymes in diseases of animals. Vet Clin Pathol. 1983,12(2):9-24.

Brock KV, Jones JB, Shull RM, Potgieter LN. Effect of canine parvovirus on erythroid progenitors in phenylhydrazine-induced regenerative hemolytic anemia in dogs. Am J Vet Res. 1989,50(6):965-9.

Brugnara C, Defranceschi L. Effect of cell age and phenylhydrazine on the cation-transport properties of rabbit erythrocytes. J Cell Physiol. 1993, 154:271-280.

Burkhard MJ, Brown DE, McGrath JP, Meador VP, Mayle DA, Keaton MJ, Hoffman WP, Zimmermann JL, Abbott DL, Sun SC. Evaluation of the erythroid regenerative response in two different models of experimentally induced iron deficiency anemia. Vet Clin Pathol. 2001, 30(2):76-85.

Cano MJ, Diez MI, Ríos MA, García MB, Gallego D, Peña M, Benedito JL, Pérez CC. Valores usuales de algunos parámetros de bioquímica plasmática en el jerbo. En: Resúmenes del VII Congreso Anual de la Sociedad Española de Medicina Interna Veterinaria (CD-ROM). 2001, 17-21. Las Palmas de Gran Canaria, España.

Cano MJ, Diez I, Ríos MA, Pérez CC, García MB, García P. Recomendaciones para el control sanitario en un centro de producción y cría de jerbos (*Meriones unguiculatus*) (resumen). Rev Exp Anim. 1995, 6(1):62.

Cano Rábano MJ, Diez Prieto MI, Ríos Granja MA, Pérez García CC, García Rodríguez MB, Gallego Morales D, Peña Penabad M. Reference hematological values in a Mongolian gerbil colony. *Rev Ciencia*. 1999, 243,23-24.

Cano Rábano MJ, Ríos Granja MA. Cuidado y mantenimiento de los animales de experimentación. En: Pérez García CC, Diez Prieto MI, García Partida P. *Introducción a la experimentación y protección animal*. 1999. León: Secr Public Univ León, p. 78-89.

Cano Rábano MJ, Ríos Granja MA, Diez Prieto MI, García Rodríguez MB, Gallego Morales D, Peña Penabad M, Pérez García CC. Aspectos relacionados con la producción de una colonia de jerbos (*Meriones unguiculatus*). *Rev Exp Anim* 1999-2000, 10-11(1-2):25-30.

Cano Rábano MJ, Ríos Granja MA, Pérez García CC, García Rodríguez MB, García Partida P, Diez Prieto I. Dones hématologiques normales chez la Gerbille de Mongolie (résumé). *Sci Tech Anim Lab*. 2001, 26(1):28.

Car BD. Erythropoiesis and Erythrokinetics. En *Schalm's Veterinary Hematology*. Feldman BF, Zinkl N, Jain NC. 2000. 5ª Ed. Philadelphia: Williams & Wilkins, 105-109.

Cary R, Dobson S, Brooke I. Concise International Chemical Assessment Document 19. Organización Mundial de la Salud. 2000.

Castro-Pacheco A, Foyo-Niembro E, Perez-Perez V, García-Hernández J, Grijalva I. Carotid-basilar artery communication in gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Rev Neurol*. 2001, 32(3):225-228.

Chang MC, Hunt DM, Turbyfill C. high resistance of Mongolian gerbil to irradiation. *Nature*. 1964, 203:536-537.

Chaworth-Musters JL, Ellerman JR. A revision of the genus *Meriones*. *Proc Zool Soc London*. 1947, 117(2-3):478-504.

Cheal MI. The gerbil: a unique model for research on aging. *Exp Aging Res* 1986, 12(1):3-21.

Chen J. *Meriones unguiculatus*. En: University of Michigan Museum of Zoology. Animal diversity web updated 2000. Disponible en URL: [http://animaldiversity.ummz.umich.edu/accounts/meriones/m.unguiculatus\\$narrative.html#phylogeny](http://animaldiversity.ummz.umich.edu/accounts/meriones/m.unguiculatus$narrative.html#phylogeny)

Clark JD. Biology and diseases of other rodents. En: Fox JG, Cohen BJ, Loew FM. *Laboratory animal medicine*. 1984. Orlando: Academic Press. p. 183-206.

Clark MM, Galef BG. Measures of growth, development and sexual maturation in mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*): effects of photic period during ontogeny. *Develop Psych*. 1985, 18:191-202.

Clark MM, Spencer CA, Galef JR. Reproductive life history correlates of early and late sexual maturation in female Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Anim Behav*. 1986, 34:551-560.

Claro LM, Leobart MSS, Comar SR, do Nascimento AJ. Effect of vitamins C and E on oxidative processes in human erythrocytes. *Cell Bioch Funct*. 2006, 24:531-535.

Conder GA, Johnson SS, Guimond PM, Cox DL, Lee BL. Concurrent infections with the ruminant nematodes *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus columbriformis* in jirds, *Meriones unguiculatus*, and use of this model for antihelmintic studies. *J Parasitol*. 1991, 77(4):621-623.

Conrad ME, Weintraub LR, Crosby WH. Iron metabolism in rats with phenylhydrazine-induced hemolytic disease. *Blood*. 1965, 25:990-998.

Cramlet SH, Jones EF. Selected topics in laboratory animal medicine. Volume III. Surgery: chronic cardiovascular bioinstrumentation. *Aeromed Rev*. 1974, 7:1-46.

Criswell KA, Sulkanen AP, Hochbaum AF, Bleavins MR. Effects of phenylhydrazine or phlebotomy on peripheral blood, bone marrow and erythropoietin in Wistar rats. *J Appl Toxicol*. 2000, 20(1):25-34.

Cromer D, Evans KJ, Schofield L, Davenport MP. Preferential invasion of reticulocytes during late-stage *Plasmodium berghei* infection accounts for reduced circulating reticulocyte levels. *Int J Parasitol.* 2006, 36(13):1389-1397.

Cumming RL, Goldberg A, Morrow J, Smith JA. Effect of phenylhydrazine-induced haemolysis on the urinary excretion of iron after desferrioxamine. *Lancet.* 1967, 1(7481):71-74.

Datta K, Soni JL, Datta IC. An avian model for the study of acute hemolytic anemia in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Biomed Biochim Acta.* 1990, 49:607-611.

De la Puente-Redondo VA, Gutiérrez-Martín CB, Pérez-Martínez C, García del Blanco N, García-Iglesias MJ, Pérez-García CC, Rodríguez-Ferri EF. Epidemic infection caused by *Citrobacter rodentium* in a gerbil colony. *Vet Rec.* 1999, 145:400-403.

DeJong K, Geldwerth D, Kuypers FA. Oxidative damage does not alter membrane phospholipids asymmetry in human erythrocytes. *Biochemistry.* 1997, 36:6768-6776.

Dhaliwal G, Cornett PA, Tierney LM Jr. Hemolytic anemia. *Am Fam Physician.* 2004, 69(11):2599-2606.

Diallo A, Gbeassor M, Vovor A, Eklú-Gadegbeku K, Aklikokou K, Agbonon A, Abena AA, de Souza C, Akpagana K. Effect of *Tectona grandis* on phenylhydrazine-induced anaemia in rats. *Fitoterapia.* 2008, 79(5):332-336.

Diehl KH, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal JM, van de Vorstenbosch C. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *J Appl Toxicol.* 2001, 21:15-23.

Diez Prieto I, García Rodríguez MB. Principales especies utilizadas en experimentación animal. En: Pérez García CC, Diez Prieto MI, García Partida P. Introducción a la Experimentación y Protección Animal. 1999. León: Secr Public Univ León, p. 31-46.

Diez-Prieto I, Ríos MA, Cano MJ, García MB, Pérez-García CC. Age- and sex-related changes in plasma copper and zinc levels in mongolian gerbil (abstract). *Contemp Topics Lab Anim Sci.* 2000, 39(4):90.

Diez-Prieto I, Ríos-Granja MA, Cano-Rábano MJ, García-Rodríguez MB, Pérez-García CC. Age and gender-related changes in copper and zinc levels in the plasma of Mongolian gerbils. *Contemp Topics Lab Anim Sci.* 2002, 41(5):27-29.

DiFrancesco L, Allen OB, Mercer NH. Long-term feeding of casein or soy protein with or without cholesterol in Mongolian gerbils. II. Plasma lipid and liver cholesterol responses. *Acta Cardiol.* 1990, 45(4):273-290.

Dillon WG, Glomski CA. Erythrocyte survival in the Mongolian Gerbil. *J Nuclear Med.* 1975, 16(7):682-684.

Dillon WG, Glomski CA. The Mongolian gerbil: qualitative and quantitative aspects of the cellular blood picture. *Lab Anim.* 1975, 9(4):183-187.

Directiva del Consejo 86/609/CEE, de 24 de noviembre de 1986, relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas relativas a la aplicación de los principios de prácticas correctas de laboratorio y al control de su aplicación para las pruebas sobre las sustancias químicas. DOCE nº L15 de 17 enero de 1987:1-29.

Dornfest BS, Bush ME, Lapin DM, Adu S, Fulop A, Naughton BA. Phenylhydrazine is a mitogen and activator of lymphoid-cells. *Ann Clin Lab Sci.* 1990, 20:353-370.

Edwards BA. The distribution of water in the intracellular and extracellular compartments and the lipid and protein composition of the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) during water deprivation. *Comp Biochem Physiol A.* 1991, 100:901-906.

Edwards BA, Donaldson K, Simpson AP. Water balance and protein intake in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Comp Biochem Physiol A.* 1983, 76(4):807-815.

Edwards BA, Peters AR. Water balance during saline imbibition in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Comp Biochem Physiol A*. 1988, 90(1):93-98.

El-Aguizy HK, Richards RD, Varma SD. Sugar cataracts in mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Exp Eye Res*. 1983, 36(6):839-844.

Ercoreca L, Giralt M, Fisiología del eritrocito. En Tresguerres J.A.F. *Fisiología Humana*. 1992. Madrid: Interamericana Mcgraw-Hill, 364-375.

Ernst S, Foerst A, Hesel H, Klünter HD, von Wedel H, Walkowiak W, Walger M. Effect of monaural deprivation on maturation of the auditory pathway in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *HNO*. 2000, 48(3):195-203.

Everse J, Hsia N. The toxicities of native and modified hemoglobins. *Free Radic Biol Med*. 1997, 22(6):1075-1099.

Falconer E. Treatment of polycythemia: The reticulocyte response to venesection, phenylhydrazin and radiation. *Ann Intern Med*. 1933, 7:172-189.

Fenn CM. Breeding of mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Anim Techn*. 1983, 34(2):119-121.

Fenske M. Adrenal function in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*): influence of confinement stress upon glucocorticosteroid, progesterone, dehydroepiandrosterone, testosterone and androstendione plasma levels, adrenal content and in-vitro secretion. *Exp Clin Endocrinol*. 1986, 87(1):15-25.

Fenske M. Rapid and fine adjustment of corticosteroidogenesis operating in the adrenal gland of the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) superperfused *in vitro*. *Exp Clin Endocrinol*. 1987, 90(2):167-177.

Fenske M. Excretion of electrolytes, free cortisol and aldosteron-18-oxo-glucuronide in 24 hr urines of the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*): effect of lisyne-vasopressin and adrenocorticotrophin administration, and on changes in sodium balance. *Comp Biochem Physiol A*. 1990, 95:259-265.

Fernández FR, Davies, AP. Teachout. DJ. Krake, A., Christopher, MM, Perman, V. Vitamin K-induced heinz body formation in dogs. J Am Anim Hosp Assoc. 1984, 20:711-720.

Ferrali M, Signorini C, Sugherini L, Pompella A, Lodovici M, Caciotti B, Ciccoli L, Comporti M. Release of free, redox-active iron in the liver and DNA oxidative damage following phenylhydrazine intoxication. Biochem Pharmacol. 1997, 53(11):1743-1751.

Field KJ, Sibold A. The Laboratory Hamster and Gerbil. 1999. Boca Raton: CRC Press, 99-142.

Flanagan JP, Lessler MA. Controlled phenylhydrazine induced reticulocytosis in the rat. Ohio J Science. 1970, 70(5):300-304.

Ford RB, Rebar AH. Anemia. En: Signos clínicos y diagnóstico en pequeños animales. Ford RB. 1992. Buenos Aires: Editorial Panamericana, 76-87.

Forkman B. The effect of hunger on the learning of new food preferences in the Mongolian gerbil. Behaviour. 1995, 132(7-8):627-639.

Frenkel G, Shaham Y, Kraicer PF. Establishment of conditions for colony-breeding of the sand-rat *Psammomys obesus*. Lab Anim Sci. 1972, 22(1):40-47.

Friedman MM, Kahn BS, Lapan B. Dehydrogenase of regenerating red blood cells in phenylhydrazine anemia. Clin Chem. 1962, 8:486-496.

Furuhama K, Kato M, Suzuki N, Igarashi K, Onodera T. The influence of single or repeated phlebotomy on the physiological condition of normal and diseased rats. J Toxicol Sci. 1987, 12(1):1-9.

Gallego Morales D. Nefropatía experimental por aminoglucósidos en el jerbo (*Meriones unguiculatus*) [tesis doctoral]. 2002. León: Universidad de León.

Gallego Morales D, Cano Rábano MJ, Pérez García CC, Ríos Granja MA, García Rodríguez MB, Peña Penabad M, García Partida P, Diez Prieto I. Gentamicin nephrotoxicity in a gerbil model. *Contemp Topics Lab Anim Sci*. 2004, 43:61.

García-Conde J, Solano C. Síndrome anémico y síndrome hemolítico. En: *Patología General: Semiología Clínica y Fisiopatología*. García-Conde J, Merino Sánchez J, González Macías J. 2004. 2ª Ed. Madrid: McGraw-Hill Interamericana, 687-695.

Giffin H, Allen E. Experiments with phenylhydrazine. I. Studies on the blood. *Ann Intern Med*. 1928, 1:655-676.

Giffin H, Conner H. The untoward effects of treatment by phenylhydrazine hydrochloride. *J Am Med Assoc*, 1929, 92:1505-1507.

Giger U. Anemias regenerativas causadas por hemorragia o hemólisis. En *Tratado de medicina interna veterinaria*. Ettinger SJ, Feldman EC. 2002. 5º Ed. Buenos Aires: Editorial Inter-Médica, 1886-1892.

Gilmour KM, Perry SF. The effects of experimental anaemia on CO₂ excretion in vitro in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Physiol Bioch*. 1996,15:83-94.

Ginsberg MD, Busto R. Rodent models of cerebral ischemia. 1989, 20(12):1627-1642.

Giralt M, Ercoreca L, Propiedades de la sangre. En: *Fisiología Humana*. Tresguerres JA. 1992. Madrid: Interamericana McGraw-Hill, 353-362.

Golab J, Olszewska D, Mroz P, Kozar K, Kaminski R, Jalili A, Jakobisiak M. Erythropoietin restores the antitumor effectiveness of photodynamic therapy in mice with chemotherapy-induced anemia. *Clin Cancer Res*. 2002, 8:1265-1270.

Goossens D, Trinh-Trang-Tan MM, Debbia M, Ripoche P, Vilela-Lamego C, Louache F, Vainchenker W, Colin Y, Cartron JP. Generation and characterization of Rhd and Rhag null mice. *Br J Haematol*. 2009, 148(1):161-72.

Gray Allan P, Wong R. Influence of coat color genes on seizure behaviour in Mongolian gerbils. *Behav Genet.* 1990, 20(4):495-499.

Gurnee CM, Drobatz KJ. Zinc intoxication in dogs: 19 cases (1991-2003). *J Am Vet Med Assoc.* 2007,230(8):1174-1179.

Hara H, Ogawa M. Erythropoietic precursors in mice with phenylhydrazine-induced anemia. *Am J Hematol.* 1975, 1:453-458.

Harkness JE, Wagner JE. The gerbil. En: *The biology and medicine of rabbits and rodents.* 1995. 4ª Ed. Philadelphia: Williams & Wilkins, p. 50-58.

Harley JD, Mauer AM. Studies on the formation of Heinz bodies. I. Methemoglobin production and oxyhemoglobin destruction. *Blood.* 1960, 16:1722-35.

Hartmann K, Fischer S, Kraft W. Pets as patients in the small animal practice. I. Descent, physiology, 1994. Williams & Wilkins, Philadelphia. p. 50-58.

Harvey JW. The erythrocyte: physiology, metabolism, and biochemical disorders. En: *Clinical Biochemistry of domestic animals.* Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML. 1997. 5ª Ed. San Diego: Academic Press, 157-188.

Hasegawa S, Rodgers GP, Shio H, Schechter AN, Uyesaka N. Impaired deformability of Heinz body forming red cells. *Bioreology.* 1993, 30:275-286.

Heinz R. Morphologische Veränderung der rothen Blutkörperchen durch Gifte. *Virchows Arch Pathol.* 1890, 122:112-116.

Hem A, Smith AJ, Solberg P. Saphenous vein puncture for blood sampling in the mouse, rat, hamster, gerbil, guinea pig, ferret and mink. *Lab Anim.* 1998, 32(4):364-368.

Hermida Vergara L, Costa Mota MC, da Gloria Sarmiento A, Lourenço Duarte CA, Barbot JM, Insuficiencia renal aguda secundaria a hemoglobinuria paroxística al frío. *An Pediatr (Barc).* 2006, 64:267-269.

Herrera García M, Estrada del Cueto M. Esferocitosis hereditaria: aspectos clínicos, bioquímicos y moleculares. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter.* 2002, 18(1):7-24.

Hessel H, Ernst LS, Walger M, von Wedel H, Dybek A, Schmidt U. *Meriones unguiculatus* (gerbil) as an animal model on the ontogenetic coclear implant research. *Am J Otol.* 1997, Supl 6:S21.

Hill HA, Thornalley PJ. Free radical production during phenylhydrazine-induced hemolysis. *Can J Chem.* 1982, 60:1528-1531.

Hill HA, Thornalley PJ. The Effect of spin traps on the phenylhydrazine-induced haemolysis. *Bioch Biophys Acta.* 1983, 762:44-51.

Ho CH, You JY, Chau WK, Hsu HC, Gau JP, Chen CC, Yu TJ. Diagnostic value of serum transferrin receptor and glycosylated hemoglobin on hemolytic anemia. *Ann Hematol.* 2003, 82(4):228-30.

Hoffman WE, Kramer J, Main AR, Torres JL. Clinical enzymology. En: Loeb WF, Quimby FW. *The clinical chemistry of laboratory animals.* 1989. New York: Pergamon Press, p. 237-278.

Hoppe-Seyler G. Über die Wirkung des Phenylhydrazins auf den Organisms. *Z Physiol Chem.* 1985, 9:34-39.

Ichimura E, Ogawa K, Taniguchi K. Morphometric studies on the effects of dehydration on the renin-immunopositive cells in the kidney of the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Jikken Dobutsu.* 1993, 42(3):327-335.

Illera JC, Lorenzo PL, Portela A, Silván G, Martínez Alesón MJ, Millán P, Illera P. Algunas características morfológicas y sanguíneas del gerbillo (*Meriones unguiculatus*). *Rev Exp Anim.* 1993, 4(2):127-134.

Iversen PO, Nicolaysen G, Benestad HB, Blood flow to bone marrow during development of anemia or polycythemia in the rat. *Blood.* 1992, 79:594-601.

Jacob J, Green V. Composition of the ventral gland-pad sebum from the Mongolian gerbil, *Meriones unguiculatus*. *Z Naturforsch.* 1977, 32(9-10):735-738.

Jain NC. Erythrocyte physiology and changes in disease. En: *Essentials of Veterinary Hematology*. Jain NC. 1993. 1ª Ed. Lippincott: Williams & Wilkins, 133-157.

Jura H, Bader A, Frosch M. In vitro activities of Benzamidazoles against *Echinococcus multilocularis* metacestodes. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998, 42(5):1052-1056.

Kakiuchi S, Kobayshi M, Satomi Y, Miura D, Kasahara Y, Kondo S. Flow cytometric analysis of erythropoietic abnormality: changes in the cell maturity index of reticulocytes and retic distribution index are useful as indicators of erythropoietic toxicity in non-clinical studies. *J Toxicol Sci.* 2006, 31(2):111-122.

Kaneko JJ. Hemoglobin Synthesis and Destruction. En *Schalm's Veterinary Hematology*. Feldman BF, Zinkl N, Jain J. 2000. 5ª Ed. Philadelphia: Williams & Wilkins, 135-139.

Karbownik M, Reiter RJ, Garcia JJ, Tan DX. Melatonin reduces phenylhydrazine-induced oxidative damage to cellular membranes: evidence for the involvement of iron. *Int J Biochem Cell Biol.* 2000. 32:1045-1054.

Kato GJ, McGowan V, Machado RF, Little JA, Taylor J, Morris CR, Nichols JS, Wang X, Poljakovic M, Morris SM, Gladwin MT. Lactate dehydrogenase as a biomarker of hemolysis-associated nitric oxide resistance, priapism, leg ulceration, pulmonary hypertension, and death in patients with sickle cell disease. *Blood.* 2006, 107:2279-2285.

Kim O, Lee JU. Experimental peritonitis induced by oral administration of indomethacin in Mongolian gerbils. *J Vet Sci.* 2006, 7(2):137-141.

Kinnamon KE, Klayman DL, Poon BT, McCall JW, Dzimianski MT, Rowan SJ. Filariasis testing in a jird model: new drug leads from some old standbys. *Am J Trop Med Hyg* 1994, 51(6):791-796.

Kino K, Mizumoto K, Watanabe J, Tsunoo H. Immunohistochemical studies on haemoglobin-haptoglobin and haemoglobin catabolism sites. *J Histochem Cytochem.* 1987, 35:381-386.

Klaus U, Weinandy R, Gattermann R. Circadian activity rhythms and sensitivity to noise in the Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Chronobiol Int.* 2000, 17(2):137-154.

Kutscher CL. Species differences in the interaction of feeding and drinking. En: *Neurobehavioral analysis of water intake and food and water interaction.* Ann NY Acad Sci. 1969, 157(2):539-552.

Laber-Laird K. Gerbils. En: Laber-Laird K, Swindle MM, Flecknell P. *Handbook of Rodent and Rabbit Medicine.* 1996. Oxford: Pergamon Press. p. 39-58.

Lay DM. The anatomy, physiology, functional significance and evolution of specialized hearing organs of gerbilline rodents. *J Morphol.* 1972, 138(1):41-120.

Leach AB, Holub BJ. The effect of dietary lipid on the lipoprotein status of the mongolian gerbil. *Lipids.* 1984, 19(1):25-33.

Leiper BD, Robinson R. Gray mutant in the Mongolian gerbil. *J Hered.* 1985, 76(6):473.

Lenox LE, Shi L, Hegde S, Paulson RF. Extramedullary erythropoiesis in the adult liver requires BMP-4/Smad5 dependent signaling. *Exp Hematol.* 2009 37(5):549-58.

Levine S, Sohn D. Cerebral ischemia in infant and adult gerbils. Relation to incomplete circle of Willis. *Arch Pathol.* 1969, 87(3):315-317.

Lim SK. Consequences of haemolysis without haptoglobin. *Redox Rep.* 2001, 6(6):375-378.

Lim YK, Jenner A, Ali AB, Wang Y, Hsu SI, Chong SM, Baumman H, Halliwell B, Lim Sk. Haptoglobin reduces renal oxidative DNA and tissue damage during phenylhydrazine-induced hemolysis. *Kidney Int.* 2000, 58(3):1033-1044.

Loew FM. Differential growth rates in male mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Can Vet J.* 1968, 9(10):237-238.

Loew FM. Mongolian gerbils. En: Canadian Council on Animal Care. Guide to the Care and Use of Experimental Animals. Vol 2. 1984. Ottawa: Canadian Council on Animal Care. p. 113-116.

Lorentzon R, Larsson HO, Boquist L. The normal parathyroid glands of the Mongolian gerbil. A quantitative structural study. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand (A).* 1984, 92(4):257-265.

Loskota WJ. The Mongolian Gerbil (*Meriones unguiculatus*) for the study of epilepsies and anticonvulsants (Doctoral Dissertation). University of California. Los Angeles, 1974. Citado en: Vincent AL, Rodrick GE, Sodeman WA. The pathology of the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*): a review. *Lab Anim Sci* 1979, 29(5): 645-651.

Loskota WJ, Lomax P. The Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) as a model for the study of the epilepsies: EEG record of seizures. *Electroen Clin Neurol.* 1975, 38(6):597-604.

Lloyd C. 2,3-Bisphosphoglycerate Metabolism in the Human Erythrocyte. 1999. En URL:http://www.cellml.org/examples/repository/erythrocyte_metabolism_1999_doc.html.

Luangaram S, Kukongviriyapan U, Pakdeechote P, Kukongviriyapan V, Pannangpetch P. Protective effects of quercetin against phenylhydrazine-induced vascular dysfunction and oxidative stress in rats. *Food Chem Toxicol.* 2007, 45:448-455.

Maines MD, Veltman JC. Phenylhydrazine-mediated induction of haem oxygenase activity in rat liver and kidney and development of hyperbilirubinaemia. Inhibition by zinc-protoporphyrin. *Biochem J.* 1984, 217(2):409-417.

Marston JH. The Mongolian Gerbil. En: Universities Federation for Animal Welfare. The UFAW handbook on the care and management of laboratory animals. 1976. 5ª Ed. Edinburg: Churchill Livingstone, p. 263-274.

Marston JH, Chang MC. The breeding management and reproductive physiology of the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Lab Anim Care.* 1965, 15(1):34-48.

Mays A. Baseline hematological and blood chemical parameters of the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Lab Anim Care.* 1969, 19(6):838-842.

Mayevsky A, Breuer A. Brain vasculature and mitochondrial responses to ischemia in gerbils. I. Basic anatomical patterns and biochemical correlates. *Brain Res.* 1992, 598(1-2):242-250.

McClelland GB, Dalziel AC, Fragoso NM, Moyes CD. Muscle remodeling in relation to blood supply: implications for seasonal changes in mitochondrial enzymes. *J Exp Biol.* 2005, 208:515-522.

McClure DE. Clinical pathology and sample collection in the laboratory rodent. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract.* 1999, 2(3):565-590.

McIsaac WM, Parke DV, Williams RT. Studies in detoxication. The metabolism of phenylhydrazine and some phenyl-hydrazones *Biochem J.* 1958, 70(4):688-97.

McMillan DC, Powell CL, Bowman ZS, Morrow JD, Jollow DJ. Lipids versus proteins as major targets of prooxidant, direct-acting haemolytic agents. *Toxicol Sci.* 2005, 88:274-283.

McMullin MF, Lappin TR, Elder GE, Taylor T, Bridges JM. Serum erythropoietic activity in acute anemia - an animal model. *Biochem Med Metab Biol.* 1989, 41(1):30-35.

Meckley PE, Ginther OJ. Delayed nidation in lactating Mongolian gerbils. *Am J Vet Res.* 1972, 33(6):1247-1251.

Meeks RG, The Rat. En: Loeb WF, Quimby FW. *The clinical chemistry of laboratory animals.* 1989. New York: Pergamon Press, 461-464.

Mejia GB, Sanz CR, Avila MM, Peraza AV, Guzmán DC, Olgúin HJ, Ramírez AM, Cruz EG. Experimental hemolysis model to study bilirubin encephalopathy in rat brain. *J Neurosci Methods.* 2008, 168(1):35-41.

Melby EC, Altman NH. Blood chemistry. En: *Handbook of laboratory animal science.* Vol 2. 1974. Cleveland: CRC Press, p. 347-436.

Meyer DJ, Harvey JW. Evaluation of erythrocytic disorders. En: *Veterinary laboratory medicine.* 2004. 3ª Ed. Missouri: Saunders, p. 47-79.

Miguélez de la Puente E. *El jerbo como modelo de envejecimiento renal*, [tesis doctoral]. 2007. León: Universidad de León.

Milne-Edwards A. Observations sur quelques mammifères du Nord de la Chine. *Ann Sci nat.* 1867, 7:375-377. Citado en: Greta Agren. Pair formation in the Mongolian gerbil. *Anim Behaviour.* 1984, 32(2):528-535.

Moore DM. Hematology of the Mongolian Gerbil (*Meriones unguiculatus*). En: Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC. *Schalm's Veterinary Hematology.* Feldman BF, Zinkl N, Jain NC. 2000. 5ª Ed. Philadelphia: Williams & Wilkins, 1111-1114.

Morton DB, Abbot D, Barclay R, Close BS, Ewband R, Gask D, Heath M, Mattic S, Poole T, Seamer J, Southee J, Thompson A, Trussel L, West C, Jennings M. Removal of blood from laboratory mammals and birds. *Lab Anim.* 1993, 27:1-22.

Motzel SL., Wagner JE. Mongolian Gerbils: Care, Diseases, and Use in Research. En: *Laboratory Animal Medicine and Science – Series II*, 2000. Disponible en URL: http://www.hawaii.edu/LAS/species_specific/pdf/9032.pdf.

Muirhead EE, Groves M, Bryan S. Positive direct Coombs test induced by phenylhydrazine. *J Clin Invest.* 1954, 33(12):1700-1711.

Naeshiro I, Yoshioka M, Chatani F, Sato S. Changes in the plasma erythropoietin level in rats following fasting, ageing, and anaemia. *Comp Haematol.* 1998, 8:87-93.

Nagahara N, Akiyama Y, Nakao M, Tada M, Kitano M, Ogawa Y. Mucoadhesive microspheres containing amoxicilin for clearance of *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998, 42(10):2492-2494.

Nakanishi A, Kinuta K, Abe T, Araki K, Yoshida Y, Liang S, Li SA, Takei K, Kinuta M. Formation of meso, N-diphenylprotoporphyrin IX by an aerobic reaction of phenylhydrazine with oxyhemoglobins. *Acta Med Okayama.* 2003, 57:249-256.

Natochin IV, Dlouha H, Lavrova EA, Pechurkina NI, Podsekaeva NI. The osmoregulating function of the kidney and activity of the loop of Henle in water rats, gerbils and Battelboro rats. *Fiziol Zh SSSR.* 1983, 69(5):695-700.

Naughton BA, Moore E, Bush ME, Lapin DM, Dornfest BS. Hemostatic alterations associated with phenylhydrazine-induced anemia in the rat. *J Med.* 1989, 20(5-6):305-330.

Nelissen M, Nelissen Joris N. On the diurnal rhythm of activity of *Meriones unguiculatus* (Milne-Edwards, 1867). *Acta Zool Pathol Antwerp.* 1975, 61:25-30.

Norris ML. Gerbils. En: Poole T. The UFAW handbook on the care and management of laboratory animals. 1987. 6ª Ed. Harlow: Longman Scientific & Technical, p. 360-376.

Norris ML, Adams CE. Vaginal opening in the Mongolian gerbil, *Meriones unguiculatus*: normal data and the influence of social factors. *Lab Anim.* 1979, 13:159-162.

Okada M, Nawa Y, Horii Y, Kitamura T, Arizono N. Development of basophils in Mongolian gerbils: formation of basophilic cell clusters in the bone marrow after *Nippostrongylus brasiliensis* infection. *Lab Invest.* 1997, 76(1):89-97.

Otken CC, Scott CE. Feeding characteristics of Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Lab Anim Sci.* 1984, 34(2):181-184.

Otken CC, Hall HE. Qualitative amino acid requirements for mongolian gerbils. *Nutr Rep Inter.* 1980, 22:409-418.

Otto-Duessel M, Aguilar M, Moats R, Wood JC. Antioxidant-mediated effects in a gerbil model of iron overload. *Acta Haematol.* 2007, 118(4):193-199.

Outfara S, Barré H, Rouanet JL, Chatonnet J. Adaptation to extreme ambient temperatures in cold-acclimated gerbils and mice. *Am J Physiol.* 1987, 253:39-45.

Outfara S, Barré H, Rouanet JL, Minaire Y. Great adaptability of brown adipose tissue mitochondria to extreme ambient temperatures in control and cold-acclimated gerbils as compared with mice. *Comp Biochem Physiol.* 1988, 90B(1):209-214.

Pagoaga I, Domínguez MJ. El gerbillo (*Meriones unguiculatus*): Biología y cuidados en estabulación. Parte 1. *Res Surg.* 1991, 3(1 Supl 7):36-40.

Paschen W, Hallmayer J, Mies G. Regional profile of polyamines in reversible cerebral ischemia of Mongolian gerbils. *Neurochem Pathol.* 1987, 7(2):143-156.

Paul A, Calleja L, Vilella E, Martinez R, Osada J, Joven J. Reduced progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice with phenylhydrazine-induced anaemia. *Atherosclerosis.* 1999, 177:61-68.

Pendergrass M, Thiessen D. Body temperature and autogrooming in the Mongolian Gerbil, *Meriones unguiculatus*. *Behav Neural Biol.* 1981, 33:524-528.

Pendergrass M, Thiessen D, Friend P. Ventral marking in the male Mongolian Gerbil reflects present and future reproductive investments. *Percept Motor Skills*. 1989, 69:355-367.

Peña M, Gallego D, Diez I, Cano MJ, García MB, Ríos MA, Pérez CC. Retroorbital venous sinus puncture in gerbil: an easy and reproducible procedure for blood sampling. *Span J Surg Res*. 2002, 5(4):227-230.

Peña Penabad M. Efectos de la adriamicina y la ciclosporina sobre la función renal en el jerbo [tesis doctoral]. 2003. León: Universidad de León.

Percy DH, Barthold SW. Gerbils. En: *Pathology of Laboratory rodents and rabbits*. 1993. Ames: Iowa State Univ Press. p. 137-145.

Pesquero J, Alfaro V, Palacios L. Acid-base analysis during experimental anemia in rats. *Can J Physiol Pharmacol*. 2000, 78(10):774-780.

Petterborg LJ, Vaughan Mk, Johnson LY, Champney TH, Reiter RJ. Modification of testicular and thyroid function by chronic exposure to short photoperiod: a comparison in four rodent species. *Comp Biochem Physiol A*. 1984, 78(1):31-34.

Pietrewicz AT, Hoff MP, Higgins SA. Activity rhythms in the Mongolian gerbil under natural light conditions. *Physiol Behav*. 1982, 29:337-380.

Pilar-Cuéllar F, Paniagua MA, Mostany R, Pérez CC, Fernández-López A. Differential effects on [35S] GTPγS binding using muscarinic agonists and antagonists in the gerbil brain. *J Chem Neuroanat*. 2005, 30:119-128.

Piovanotti MRA, Vieira ML. Presence of the father and parental experience have differentiated effects on pup development in Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Behav Proc*. 2004, 66:107-117.

Port CD, Baxter DW, Richter WR. The Mongolian gerbil as a model for lead toxicity. I. Studies of a acute poisoning. *Am J Pathol*. 1974, 76(1):79-94.

Quimby FW. The Mouse. En: Loeb WF, Quimby FW. The clinical chemistry of laboratory animals. 1989. New York: Pergamon Press, p. 6-18.

Ragan HA. Markets of renal function and injury. En: Loeb WF, Quimby FW. The clinical chemistry of laboratory animals. 1989. New York: Pergamon Press, p. 321-343.

Real Academia Española. Diccionario de la Real Academia Española, vigésima segunda edición (2001).

Real Decreto 1201/2005, de 10 de octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. Boletín Oficial del Estado número 252 de 21 de Octubre de 2005.

Redondo PA, Alvarez AI, Diez C, Fernández-Rojo F, Prieto JG. Physiological response to experimentally induced anemia in rats: a comparative study. Lab Anim Sci. 1995, 45(5):578-583.

Refinetti R. Relationship between the daily rhythms of locomotor activity and body temperature in eight mammalian species. Am J Physiol. 1999, 277(46):1493-1500.

Research Animal Resource. University of Minnesota. Disponible en URL: <http://www.ahc.umn.edu/rar/refvalues.html>

Rice AC, Shapiro SM. A new animal model of hemolytic hyperbilirubinemia-induced bilirubin encephalopathy (*kernicterus*). Pediatr Res. 2008, 64(3):265-269.

Rigdon RH. Acute anemia produced by phenylhydrazine hydrochloride in the duck – observation on nucleated erythrocytes in vivo. Tex Rep Biol Med. 1953, 11:110-121.

Robbins ME. Seizure resistance in albino gerbils. Lab Anim. 1976, 10(3):233-235.

Robinson DG. Gerbil classification and nomenclature. Gerbil Digest. 1975, 2(1):1-4.

Robinson DG. Physiological parameters and selected general data. *Gerbil Digest* 1979, 6:1-2.

Rodríguez Perón JM, Menéndez López JR, Trujillo López Y. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Rev Cub Med Mil.* 2001, 30(1):15-20.

Romero PJ, Romero EA. Determinant factors for an apparent increase in oxygen affinity of senescent human erythrocytes. *Acta Cient Venez.* 2004, 55:83-85.

Rokushima M, Omi K, Araki A, Kyokawa Y, Furukawa N, Itoh F, Imura K, Takeuchi K, Okada M, Kato I, Ishizaki J. A toxicogenomic approach revealed hepatic gene expression changes mechanistically linked to drug-induced hemolytic anemia. *Toxicol Sci.* 2007, 95(2):474-484.

Rosa RA, Glomski CA. The Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*): its histological and haematological response to methylcellulose. *Lab Anim.* 1981, 15(2):131-136.

Rosowski JJ, Ravicz ME, Teoh SW, Flandermeyer D. Measurements of Middle-ear function in the Mongolian Gerbil, a specialized Mammalian ear. *Audiol Neuro Otol* 1999, 4:129-136.

Sato T, Oite T, Nagasr M, Shimizu F. Nephrotoxic serum nephritis in nude rats: the roles of host immune reactions. *Clin Exp Immunol.* 1993, 84(1):139-144.

Savides MC, Oehme FW, Nash SL, Leipold HW. The toxicity and biotransformation of single doses of acetaminophen in dogs and cats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1984, 74(1):26-34.

Schechter RD, Schalm OW, Kaneko JJ. Heinz body hemolytic anemia associated with the use of urinary antiseptics containing methylene blue in the cat. *J Am Vet Med Assoc.* 1973, 162(1):37-44.

Scheibler E, Winandy R, Gattermann R. Social categories in families of Mongolian gerbils. *Physiol Behav.* 2004, 81:455-464.

Scheibler E, Weinandy R, Gattermann R. Intra-family aggression and offspring expulsion in Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*) under restricted environments. *Mammal Biol.* 2005, 70(3):137-146.

Serrano JC, Ball M, Velasques D. Papel de los Calcio-Antagonistas en el control de eventos Vaso-Oclusivos y Hemolíticos en Drepanocitosis. Estudio piloto con Nitrendipina. *Arch Venez Farmacol Ter.* 2001, 20(2):152-162.

Shaham Y, Lelyveld J, Marder U, Mendelssohn H, Paz G, Kraicer PF. Establishment of an albino sand rat (*Psammomys obesus*) colony and comparison with the natural coloured animal. *Lab Anim.* 1978, 12(1):13-17.

Sharma ML, Soni JL, Atta K. Pathomorphological changes in calf erythrocytes during phenylhydrazine-induced acute haemolytic anemia. *Arch Exp Veterinarmed.* 1991, 5:45-78.

Sheeler P, Barber AA. Reticulocytosis and iron incorporation in the rabbit and turtle: a comparative study. *Comp Biochem Physiol.* 1965, 16(1):63-76.

Shinnou M, Ueno M, Sakamoto H, Ide M. Blood brain barrier damage in reperfusion following ischemia in the hippocampus of the Mongolian gerbil brain. *Acta Neurol Scand.* 1998, 98(6):406-411.

Simpson GG. The principles of classification and a classification of mammals. *Bull Amer Mus nat History* 1945. 85:213. Citado en: Marston JH. The Mongolian gerbil. En: Universities Federation for Animal welfare. The UFAW handbook on the care and management of laboratory animals. 1976. 5ª ed. Edimburg: Churchill Livingstone, p. 263-274.

Smith RA, Termer EA, Glomski CA. Erythrocyte basophilic stippling in the Mongolian gerbil. *Lab Anim.* 1976. 10(10):379-383.

Smith SM, Kapland HM. Ketamine-methoxyflurane anaesthesia for the Mongolian gerbil, *Meriones unguiculatus*. *Lab Anim.* 1974, 8(2):213-216.

Spice RN. Hemolytic anemia associated with ingestion of onions in a dog. *Can Vet J*. 1976, 17(7):181-183.

Steffen JM, Roberts JC. Temperature acclimation in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*): biochemical and organ weight changes. *Comp Biochem Physiol*. 1977, 58(3):237-242.

Stern A. Drug-induced oxidative denaturation in red blood cells. *Semin Hematol*. 1989, 26:301-306.

Stockham S, Scott MA. Erythrocytes. En: *Fundamentals of veterinary clinical pathology*. Stockham S, Scott MA. 2002. 1ª Ed. Iowa: Blackwell Publishing Professional, p. 87-150.

Suedkamp M, Lercher AJ, Mueller-Riemenschneider F, LaRosee K, Tossios P, Mehlhorn U. Hemolysis parameters of St. Jude Medical: Hemodynamic Plus and Regent valves in aortic position. *Int J Cardiol*. 2004, 95(1):89-93.

Susic V, Masirevic G. Sleep patterns in the Mongolian gerbil, *Meriones unguiculatus*. *Physiol Behav*. 1986, 37:257-261.

Suzuki F, Nakao N, Nikaido O, Ondo S. High resistance of cultured Mongolian gerbil cells to S-ray-induced killing and chromosome aberrations. *Radiat Res*. 1992, 131(3):290-296.

Swanson HH. The "hairless" gerbil: a new mutant. *Lab Anim*. 1980, 14(2):143-147.

Takayanagi TH, Akao N, Suzuki R, Tomoda fM, Tsukidate S, Fujita K. New animal model for human ocular toxocariasis: ophthalmoscopic observation. *Br J Ophthalmol*. 1999, 83(8):967-972.

Tam SC, Wong JT. Impairment of renal function by stroma-free hemoglobin in rats. *J Lab Clin Med*. 1988, 111(2):189-193.

Termer EA, Glomski CA. The cellular blood picture of the Mongolian gerbil throughout the first year of life: a longitudinal study. *Exp Hematol*. 1978, 6(5):499-504.

Thiessen DD. Body temperature and grooming in the Mongolian gerbil. *Ann New York Acad Sci*. 1988, 525:27-39.

Thiessen DD, Harriman AE. Harderian gland exudates in the male *Meriones unguiculatus* regulate female proceptive behavior, aggression and investigation. *J Comp Psychol*. 1986, 100(1):85-87.

Thiessen DD, Kittrell EM. The harderian gland and thermoregulation in the gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Physiol Behav*. 1980, 24(3):417-424.

Thiessen DD, Pendergrass M, Young RK. Development and expression of autogrooming in the Mongolian Gerbil, *Meriones unguiculatus*. *J Comp Psychol*. 1983, 97(3):187-190.

Thiessen DD, Yahr PI, Owen K. Regulatory mechanisms of territorial marking in the Mongolian gerbil. *J Comp Psychol*. 1973, 82(3):382-392.

Timm KI. Orbital venous anatomy of the Mongolian gerbil with comparison to the mouse, hamster and rat. *Lab Anim Sci*. 1989, 39(3):262-264.

Turner JW, Carbonell C. A relationship between frequency of display of territorial marking behavior and coat color in male Mongolian gerbils. *Lab Anim Sci*. 1984, 34(5):488-490.

Twersky LH, Bartley AD, Rayos N, Cohen WD. Immature erythroid-cells with novel morphology and cytoskeletal organization in adult *Xenopus*. *Protoplasma*. 1995, 185:37-49.

Unami A, Nishina N, Terai T, Sato S, Tamura T, Noda K, Mine Y. Effects of cisplatin on erythropoietin production in rats. *J Toxicol Sci*. 1996, 21(3):157-165.

Vannucchi AM, Bianchi L, Cellai C, Paoletti F, Carrai V, Calzolari A, Centurione L, Lorenzini R, Carta C, Alfani E, Sanchez M, Migliaccio G, Migliaccio AR. Accentuated response to phenylhydrazine and erythropoietin in mice genetically impaired for their GATA-1 expression (GATA-1 (low) mice). *Blood*. 2001, 97(10):3040-3050.

Vincent AL, Rodrick GE, Sodeman WA. The pathology of the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*): a review. *Lab Anim Sci*. 1979, 29(5):645-651.

Visvesvara GS, Dickerson JW, Healy GR. Variable infectivity of human-derived *Giardia lamblia* cysts for Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *J Clin Microbiol*. 1988, 26(5):837-841.

Voigt GL. Forma de los eritrocitos, funciones e índices. En: Conceptos y técnicas hematológicas para técnicos veterinarios. 2003. Zaragoza: Acribia, p. 15-90.

Wallace P, Owen K, Thiessen DD. The control and function of maternal scent marking in the Mongolian gerbil. *Physiol Behav*. 1973, 10(3):463-466.

Wasan KM, Najafi S, Wong J, Kwong M. Assessing plasma lipid levels, body weight and hepatic and renal toxicity following chronic oral administration of a water soluble phytostanol compound, FM-VP4, to gerbils. *J Pharm Pharmaceut Sci*. 2001, 4(3):228-234.

Waugh RE, Narla M, Jackson CW, Mueller TJ, TSuzuki T, Dale GL. Rheologic properties of senescent erythrocytes: loss of surface area and volume with red blood cell age. *Blood*. 1992, 79(5):1351-1358.

Weeks AM, Glomski CA. Cytology of the bone marrow in the Mongolian gerbil. *Lab Anim*. 1978, 12:195-202.

Weinert D, Nevill A, Weinandy R, Waterhouse J. The development of new purification methods to assess the circadian rhythm of body temperature in Mongolian Gerbils. *Chronobiol Int*. 2003, 20(2):249-270.

West CD. Jerbos. En: Beynon PH, Cooper JE. Manual de Animal Exóticos. 1999. Barcelona: Ediciones S, p. 33-41.

Williams WM. The Anatomy of the Mongolian Gerbil (*Meriones unguiculatus*). 1974. West Brookfield Tumblebrook Farm.

Womack JE, Red cell survival in the gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Comp Biochem Physiol*. 1972, 43(4):801-804.

Wolf DC, Carlton WW, Turek JJ. Experimental renal papillary necrosis in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Toxicol Pathol*. 1992, 20(81):341-349.

Wong R, Gray Allan P, Chiba C, Alfred B. Social preference of female gerbils (*Meriones unguiculatus*) as influenced by coat color of males. *Behav Neural Biol*. 1990, 54(2):184-190.

Wu JT. Artificial insemination and induction of pregnancy in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *J Reprod Fertil*. 1974, 37(1):139-140.

Xie LD, Gu L, Yan ZY, Yao WJ, Sun DG, Wen ZY. The microrheological changes in the course of erythrocyte senescence after phenylhydrazine injection. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2003, 28:5-11.

Yahr P, Kessler S. Suppression of reproduction in water-deprived Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Biol Reprod*. 1975, 12(2):249-254.

Yang T, Brittenham GM, Dong WQ, Levy MN, Obejero-Paz CA, Kuryshev YA, Brown AM. Deferoxamine prevents cardiac hypertrophy and failure in the gerbil model of iron-induced cardiomyopathy. *J Lab Clin Med*. 2003, 142(5):332-340.

Yeshoda KM. Phenylhydrazine anaemia in rats. *Curr Sci*. 1942, 11:360-363.

Zeman FJ. A semipurified diet for the Mongolian Gerbil (*Meriones unguiculatus*). *J Nutr*. 1967, 91(4):415-420.

Zivny JH, Gelderman MP, Xu F, Piper J, Holada K, Simak J, Vostal JG. Reduced erythroid cell and erythropoietin production in response to acute anemia in prion protein-deficient (Prnp^{-/-}) mice. *Blood Cells Mol Dis*. 2008, 40(3):302-307.