



# GUÍA DE LABORATORIO DE HEMATOLOGÍA



## ELABORARON:

Dr. Eduardo Rivadeneyra Domínguez

M. en C. Ricardo Galán Zamora

Q.F.B. Isaac Zamora Bello

## **PRESENTACIÓN**

La presente Guía de Prácticas de Laboratorio de Hematología está diseñada de acuerdo al programa de teoría de Hematología que forma parte del área de formación a la disciplina del plan de estudios vigente de la Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo de la Universidad Veracruzana Región Xalapa. Las prácticas de laboratorio propuestas en esta guía tienen el propósito de que los estudiantes desarrollen competencias en la ejecución e interpretación de pruebas básicas de laboratorio de hematología. El contenido está diseñado para lograr su correlación con el curso teórico abarcando la metodología analítica tanto manual como semi-automatizada que permite el estudio de los distintos elementos formes de la sangre y del sistema hemostático. Las prácticas están divididas en tres secciones: serie roja, serie blanca y hemostasia. Durante el desarrollo del curso los estudiantes aprenden y ponen en práctica las medidas de bioseguridad y en el manejo de residuos biológico-infecciosos. La metodología promueve el desarrollo de habilidades de ejecución y de pensamiento que permitan al estudiante tener un buen desempeño en un laboratorio de hematología; fomenta tanto el trabajo individual como colectivo. En la evaluación del aprendizaje se consideran la realización de prácticas, participación, entrega de reportes por escrito, así como exámenes teóricos y prácticos.

Finalmente, es importante que el estudiante mantenga un registro completo de sus experimentos, por lo que los docentes que imparten esta experiencia educativa recomiendan el uso de una bitácora, cuyo objetivo es que el alumno conozca y aprenda la forma en que se realizó el desarrollo experimental, además en ella se deberán escribir los resultados, cálculos, conclusiones, etc. Este registro se hace al momento en que se realiza la práctica y debe estar escrito de manera clara para que cualquiera pueda entender cómo se realizó la práctica y cuáles fueron los resultados obtenidos.

## JUSTIFICACIÓN

El Laboratorio de Hematología constituye una parte fundamental de la formación del Químico Farmacéutico Biólogo (Q.F.B.) en el área clínica ya que está enfocado al desarrollo de habilidades en el estudiante para que éste sea capaz de dominar la metodología analítica utilizada, para la ejecución de distintas pruebas indispensables para el diagnóstico de diversos trastornos hematológicos y que le permitirán, por lo tanto, su integración al mercado laboral. El Laboratorio de Hematología pone de manifiesto en el estudiante la importancia de la preparación del paciente, las condiciones para la toma de muestra, así como el adecuado manejo de las mismas. La realización de las pruebas utilizando métodos manuales y semi-automatizados permitirá al estudiante comprender sus ventajas y desventajas. Es importante resaltar, que si bien es cierto en la actualidad la gran mayoría de los laboratorios clínicos utiliza equipos automatizados para procesar las muestras, y en caso de que éstos equipos llegaran a sufrir una avería técnica, el Q.F.B., deberá recurrir a los métodos manuales para poder sacar adelante el trabajo, es por ello que se debe hacer énfasis en que aprendan correctamente a ejecutar cada una de las técnicas que se les enseña en cada práctica, y de esta manera tener una preparación holística en el campo de la Hematología, además de que esta experiencia educativa fomenta en el alumno el trabajo en equipos inter y multidisciplinarios, así como el trato adecuado a los pacientes.

## INTRODUCCIÓN

La compilación de la Guía de Prácticas del Laboratorio de Hematología se hizo con el propósito de brindar a los alumnos de la carrera de Químico Farmacéutico Biólogo de la Universidad Veracruzana Región Xalapa, un auxiliar didáctico en la enseñanza del laboratorio de Hematología, que permita a los docentes que imparten esta experiencia educativa y a los alumnos que la cursan, un programa homogéneo de prácticas para ser utilizadas por las diferentes secciones del citado laboratorio.

Dicha guía está integrada por 27 prácticas de las cuales se describe su tiempo de duración, objetivo, fundamento, generalidades, equipo, material biológico y de laboratorio, técnica y bibliografía. **Al final se incluyen anexos que contienen alteraciones más comunes de la serie roja y su significado clínico, plan de manejo de residuos peligrosos, medidas de seguridad y salud ocupacional, casos clínicos para las series roja, blanca y**

**hemostasia, además de 6 prácticas complemento que en caso de contar con reactivos y equipos así como el tiempo extra para su realización, se llegarían a ejecutar. También se cuenta con una sección de automatización en hematología y un último anexo para la preparación de reactivos.** Es conveniente mencionar que en esta compilación se incluyeron casos clínicos, los cuales serán de mucha utilidad a los alumnos para poder relacionar sus conocimientos teóricos con los prácticos y así ser capaces de establecer diagnósticos, ayudando de esta manera a la comunidad médica. En Hematología, como en otras disciplinas de la medicina, se requiere combinar el estudio clínico minucioso del paciente y el empleo de las pruebas especiales con objeto de ofrecer una atención de calidad para los enfermos con padecimientos hematológicos primarios y otros, que de manera secundaria, tienen afección del tejido hematopoyético. El empleo riguroso de dicha combinación puede ser de gran impacto para la detección temprana de algunas enfermedades que podrían repercutir en una evolución más favorable e incluso la curación.

La combinación de la información clínica y del laboratorio en el estudio del paciente es deficiente en países como el nuestro por diversas razones, pero se puede inferir que depende en gran parte de la falta de un buen curso de Hematología durante la formación básica de los alumnos en las ciencias biomédicas. A continuación se cita un ejemplo de la falta de preparación de profesionales en el área de la Biomedicina: Un Químico informa la presencia de esquizocitos abundantes en sangre periférica en una paciente internada en terapia intensiva con alteraciones neurológicas, falla renal, anemia y trombocitopenia. El médico no conoce el significado diagnóstico de dicha anomalía y por tanto, la posibilidad diagnóstica de púrpura trombocitopénica trombótica no se considera y la enferma recibe tratamiento inadecuado y muere. Es por eso que, aprendiendo correctamente las técnicas y conociendo la morfología de las células sanguíneas, se puede contribuir a un buen diagnóstico que sin lugar a dudas, impactará de manera positiva en el seguimiento y tratamiento del paciente.

## ÍNDICE

### SERIE ROJA

NÚMERO DE PRÁCTICA	NOMBRE	PÁGINA
1	PREPARACIÓN DE ANTICOAGULANTES	1
2	OBTENCIÓN DE MUESTRAS SANGUÍNEAS	8
3	PREPARACIÓN DE EXTENDIDOS SANGUÍNEOS	16
4	ERITROSEDIMENTACIÓN (VELOCIDAD DE SEDIMENTACIÓN GLOBULAR)	24
5	DETERMINACIÓN DEL HEMATÓCRITO	29
6	RECUENTO DE GLÓBULOS ROJOS	35
7	CUANTIFICACIÓN DE HEMOGLOBINA	40
8	RECUENTO DE RETICULOCITOS	46
9	DETERMINACIÓN DE HIERRO SÉRICO	50
10	DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE FIJACIÓN DE HIERRO	55
11	FRAGILIDAD OSMÓTICA DE LOS ERITROCITOS (FOE)	59
12	OBSERVACIÓN DE CUERPOS DE HEINZ	64
13	PREPARACIÓN DE HEMOLISADOS	66
14	CUANTIFICACIÓN DE HEMOGLOBINA FETAL	68

### SERIE BLANCA

<b>NÚMERO DE PRÁCTICA</b>	<b>NOMBRE</b>	<b>PÁGINA</b>
15	RECUENTO DE LEUCOCITOS	71
16	RECUENTO DIFERENCIAL DE LEUCOCITOS (HEMOGRAMA)	80
17	CITOMETRÍA HEMÁTICA COMPLETA (BIOMETRÍA HEMÁTICA COMPLETA)	89
18	CITODIAGNÓSTICO DE EXUDADOS	107
19	TINCIÓN DEL SUDÁN NEGRO B	114

### HEMOSTASIA

<b>NÚMERO DE PRÁCTICA</b>	<b>NOMBRE</b>	<b>PÁGINA</b>
20	RECUENTO DE PLAQUETAS	119
21	DETERMINACIÓN DE LA FRAGILIDAD CAPILAR	124
22	RETRACCIÓN DEL COÁGULO	128
23	DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE COAGULACIÓN Y DEL TIEMPO DE SANGRADO	133
24	DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE PROTROMBINA	139
25	DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADA	147
26	DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE TROMBINA	151
27	CUANTIFICACIÓN DE FIBRINÓGENO (TROMBINA)	157
	BIBLIOGRAFÍA	164

## ANEXOS

01	ALTERACIONES MÁS COMUNES DE LA SERIE ROJA Y SU SIGNIFICADO CLÍNICO	166
02	PLAN DE MANEJO DE RESIDUOS PELIGROSOS	170
03	MEDIDAS DE SEGURIDAD Y SALUD OCUPACIONAL	191
04	CASOS CLÍNICOS	195
05	PRÁCTICAS COMPLEMENTARIAS <ul style="list-style-type: none"> <li>• INDUCCIÓN DE DREPANOCITOS</li> <li>• DETECCIÓN DE DEFICIENCIA DE GLUCOSA 6-FOSFATO DESHIDROGENASA</li> <li>• RECUENTO DE EOSINÓFILOS</li> <li>• REACCIÓN DE LA MIELOPEROXIDASA (PEROXIDASA LEUCOCITARIA)</li> <li>• TINCIÓN DE SCHIFF DEL ÁCIDO PERYÓDICO (PAS)</li> <li>• AUTOMATIZACIÓN EN HEMATOLOGÍA</li> </ul>	212
06	PREPARACIÓN DE REACTIVOS	250

### Evaluación del desempeño

Evidencia (s) de desempeño	Criterios de desempeño	Ámbito(s) de aplicación	Porcentaje
Realización de trabajo práctico	Eficiencia, limpieza, seguridad, fluidez, orden	Laboratorio	30
Discusiones grupales	suficiencia, pertinencia, coherencia, fluidez, claridad,	Laboratorio	20
Reportes de las prácticas	suficiencia, pertinencia, coherencia, oportunidad, veracidad, claridad,	Laboratorio	20
Exámenes teóricos de	Suficiencia, pertinencia,	Laboratorio	30

preguntas abiertas y de opción múltiple	coherencia, claridad		
---	----------------------	--	--

### **Acreditación**

El porcentaje total obtenido en la evaluación sumativa dividido entre 10 corresponde a la calificación del alumno, por lo que el mínimo para acreditar la materia será de 60 % y corresponde una calificación de seis.

La calificación final de la experiencia educativa incluirá el desempeño del alumno tanto en el curso teórico como en el laboratorio de acuerdo a los siguientes porcentajes:

Teoría 60%

Laboratorio 40%

**Siendo requisito indispensable obtener calificación aprobatoria en ambos.**

FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA  
LABORATORIO DE HEMATOLOGÍA  
PRÁCTICA N.º 1  
“PREPARACIÓN DE ANTICOAGULANTES”  
**DURACION: 01 HR**

**OBJETIVO(S):**

Que el alumno aprenda a preparar correctamente los principales anticoagulantes de importancia en hematología, así como también seleccionar el más adecuado para cada determinación.

**FUNDAMENTO:**

Debido a que en hematología se requiere estudiar a la sangre con sus elementos formes, así como hacer recuentos de células y revisiones morfológicas, es indispensable obtener la sangre con un anticoagulante que sea capaz no sólo de mantener la sangre sin coagularse, sino que preserve, de la mejor manera posible, la morfología celular. Para esto, existen diversos anticoagulantes, que actúan de diferentes modos: la heparina es un inactivador de la trombina y de la tromboplastina; los citratos, oxalatos y EDTA remueven el calcio, ya sea precipitándolo como sal (oxalatos) o fijándolo en forma no ionizada (citratos y EDTA). La desfibrinación es un método alternativo para obtener sangre líquida mediante la remoción de la fibrina formada al coagularse la sangre. Sin embargo, de esta manera no se evita la coagulación y, por lo tanto, la sangre pierde diversos factores de coagulación, pudiendo sufrir alteraciones morfológicas y volumétricas. Por ello, su uso se restringe a algunos estudios especiales.

No debemos olvidar que una cantidad insuficiente de anticoagulante puede provocar una coagulación parcial y que el exceso del mismo diluye la muestra, con los consecuentes errores de medición. Por otro lado, un anticoagulante inadecuado puede ocasionar distorsión de las células. Por lo anterior, resulta obvia la importancia que tiene la elección y dosificación correcta del anticoagulante.

Cuando requerimos estudiar los factores de la coagulación, es conveniente utilizar, adicionalmente, material siliconizado, con la finalidad de retrasar la activación del Factor XII y la adherencia de las plaquetas a las paredes del tubo.

**GENERALIDADES:**

El oxalato de sodio puede interferir con los puntos fotoópticos en los instrumentos automáticos de coagulación ya que se forman precipitados de complejos de calcio. La sangre se coloca en tubos que contienen citrato de sodio a 3.8% con una relación final de nueve partes de sangre por una de anticoagulante. Si el hematócrito es superior a 55% o menor de 20%, la cantidad de citrato de sodio debe ajustarse de acuerdo a esto, ya que la proporción del calcio en el plasma con el citrato es importante para obtener resultados precisos. Un exceso de citrato en el plasma puede dar un tiempo de coagulación prolongado en las pruebas de protrombina, mientras que un exceso de calcio puede promover la coagulación y dar lugar a un tiempo de coagulación acortado con estas pruebas.

El uso de una concentración menor de citrato, 3.2%, en la misma sangre para una preparación de anticoagulante ha sido adoptado por el international Committe for

Standardization in Hematology y parece superar los problemas de las pruebas vinculados con muestras que presentan aumento del hematócrito.

Una vez tomada la sangre para las pruebas, éstas deben completarse dentro de un límite de tiempo de 30 minutos a 2 horas, ya que comienzan a producirse cambios tan pronto como se obtiene la sangre. En la sangre vertida, los factores de contacto se activan al entrar en contacto con la superficie del tubo. Por tanto, las muestras deficientes en los factores de contacto pueden mostrar una coagulabilidad aumentada cuando las pruebas se retardan, especialmente si el plasma se almacena en tubos de vidrio. Algunos tubos de vidrio para pruebas de coagulación están siliconizados para reducir al mínimo la activación de estos factores. Además el factor V y el factor VII son lábiles y pueden comenzar a disminuir con el almacenamiento prolongado.

Las pruebas para detectar la integridad del sistema de coagulación requieren plasma escaso en plaquetas, mismo que debe tener una cifra residual de plaquetas menor de  $15 \times 10^9/L$ . Este plasma se prepara mediante centrifugación de la sangre a un mínimo de RFC de 1000 xg durante 10 a 15 minutos. El plasma se retira inmediatamente de las células y se coloca en tubos de material plástico o siliconizado tapados en el refrigerador a 4° C. Los cambios producidos en la muestra dentro de un lapso de dos horas son mínimos. Si es necesaria la congelación del plasma esto debe hacerse rápidamente a 70° C para evitar la desnaturalización de las proteínas de la coagulación. Cuando la prueba comienza, el plasma debe congelarse rápidamente a 37° C.

Además de la preparación cuidadosa de la muestra de sangre, los resultados precisos de la prueba de coagulación también dependen de las técnicas de punción venosa sin traumatismo. En las punciones traumatizantes puede penetrar tromboplastina tisular a la muestra y activar la vía extrínseca de la cascada de la coagulación y producir resultados erróneos en la prueba sobre un plasma preactivado. Para evitar la contaminación de la muestra con tromboplastina tisular algunos laboratorios obtienen regularmente dos tubos de sangre; descartan el primero y usan el segundo para las pruebas de coagulación.

La heparina es un mucopolisacárido sulfonato que tiene repetidas unidades des de disacáridos que son ácidos idurónico y N acetil glucosamina. Hay dos o tres grupos sulfato unidos a la unidad disacárido y, en la terminal reducida del azúcar, las moléculas se unen in vivo a varios residuos seril presentes en las proteínas de unión específicas. Hay que hacer notar que las moléculas son “polidispersas” con un peso molecular que va de 6000 a 14000. Se requiere una secuencia de tetrasacáridos específica con dos residuos de ácido urónico no sulfonado, para la actividad anticoagulante que es mediada a través de su unión a la antitrombina III. El complejo heparina-antitrombina es un inhibidor potente e inmediato de las proteasas de coagulación activadas.

Las fracciones activadas de anticoagulantes de la heparina representan una porción variable y relativamente pequeña de las preparaciones comerciales. Los órganos o especies que le dan origen, o el proceso de preparación pueden producir heparinas de diferentes actividades específicas, aunque no hay un beneficio terapéutico claro de ninguna de las preparaciones sobre el tipo disponible de intestino porcino. En consecuencia, las dosis se estandarizan para el efecto anticoagulante, esto es, las unidades se oponen al peso usando las pruebas de

detección de la coagulación. Un efecto fisiológico de la heparina se manifiesta por la inhibición inmediata de las pruebas de coagulación. El tiempo de trombina es el más sensible tal como está muy prolongado incluso en 0.01 unidad por ml de heparina.

Hay un gran número de preparaciones de anticoagulantes con citratos disponibles en el comercio preparados en tubos al vacío. Hay que tener cuidado de usar el mismo anticoagulante que en el control normal de plasma con el que se están estandarizando las pruebas de detección selectiva. El EDTA también es un quelante muy fuerte del  $\text{Ca}^{++}$  para las pruebas de detección de coagulación, y causa resultados dudosos. En algunas ocasiones, la heparina contamina de manera inadvertida la muestra. Los resultados confiables de las pruebas de coagulación todavía pueden obtenerse usando una columna simple. Hay una concentración óptima de  $\text{Ca}^{++}$ , y se pueden presentar problemas por el exceso o demasiado poco anticoagulante en casos de policitemia o anemia más grave, respectivamente.

Hay que tomar precauciones para prevenir errores en el análisis de las células sanguíneas como consecuencia de los cambios in vitro de la sangre más EDTA. Las extensiones se deben preparar inmediatamente. Si no se pueden realizar otras determinaciones en él término de 2 o 3 horas, la sangre debe refrigerarse a 4° C. En la mantenida a temperatura ambiente de laboratorio, la hinchazón de los eritrocitos entre las 6 y 24 horas aumenta el hematócrito y el VCM, y disminuye la concentración corpuscular media de hemoglobina (CCHM) y la velocidad de sedimentación. Sin embargo, a las 24 horas, los recuentos de glóbulos blancos y rojos, hemoglobina, hematócrito e índice eritrocitario no se ven modificados en sangre almacenada con EDTA a 4° C. En tales condiciones también ocurre para el recuento de reticulocitos y plaquetas. La velocidad de sedimentación se debe calcular en el término de 2 horas. Antes de tomar una muestra de un tubo con sangre venosa para una determinación hematológica, es importante mezclar la sangre completamente. Si el tubo ha estado de pie, debe invertirse al menos 60 veces o colocarlo durante 2 min. en un rotador mecánico, pues de lo contrario la precisión se vería inaceptablemente afectada.

#### EQUIPO:

Balanza Analítica

#### MATERIAL:

- a) Biológico : Ninguno
- b) De laboratorio:

Oxalato de amonio

Oxalato de potasio

Citrato disódico

Dextrosa

Ácido Etilen Diamino Tetraacético

Heparina

Tubos de ensayo de 13 x 100, con tapón

Agua destilada

Matraces aforados de 100 ml

Tubos de centrifuga graduados de 5 ml

Pipetas serológicas de 5 ml

## TÉCNICA:

### OXALATOS

Se utiliza la mezcla de oxalatos de amonio y potasio en proporción de 3:2, la que es conocida como mezcla de **Wintrobe o de Heller y Paul**. La sal de amonio tiende a aumentar el volumen eritrocitario en tanto que la de potasio lo disminuye. Con las proporciones mencionadas, se logra mantener el volumen sin alteraciones.

#### Preparación:

Oxalato de amonio. ....	1.2 g
Oxalato de potasio. ....	0.8 g
Agua destilada .....	100 ml

En tubos con tapón, se coloca 0.1 ml de anticoagulante por cada ml de sangre que se vaya a depositar, es decir, que si necesitamos 5 ml de sangre, deberemos colocar 0.5 ml de la mezcla de oxalatos. Con la finalidad de evitar la dilución, los tubos preparados se ponen en un incubador hasta que se evapore el agua y quede únicamente el polvo seco.

#### VENTAJAS:

1. Bajo Costo
2. No modifica el volumen eritrocitario y por lo tanto puede utilizarse para determinaciones de hemoglobina, hematocrito y recuentos globulares.
3. El plasma obtenido se puede utilizar para otros exámenes (como bioquímicos por ejemplo), exceptuando aquellos en los que el nitrógeno contenido en el oxalato de amonio pudiera ocasionar una interferencia, como en las determinaciones de urea.

#### DESVENTAJAS:

1. Puede producir hemólisis.
2. No se pueden hacer extendidos sanguíneos después de algunos minutos, ya que se producen alteraciones leucocitarias como: vacuolas en los neutrófilos, degeneración nuclear en los leucocitos, fagocitosis de cristales de oxalato.
3. Pueden producir formas dentadas en los eritrocitos.

#### CITRATOS:

##### A) Citrato de sodio

Se utiliza el citrato sódico en solución a 3.8%, que es isotónica.

#### PREPARACIÓN:

Citrato disódico. ....	3.8g.
Agua destilada.....	100 ml.

En tubos, de preferencia graduados, se colocan 0.5 ml de la solución de citrato de sodio, para aforar a 5 ml de sangre. Su uso se ha restringido al estudio de la coagulación.

VENTAJAS:

1. Es excelente para realizar pruebas de coagulación.
2. Bajo costo.
3. Evita la aglutinación de plaquetas.

DESVENTAJAS:

1. No es muy útil para estudios morfológicos pues altera la morfología eritrocitaria y leucocitaria.
2. Debido a que ocasiona dilución importante (1 a 10) no es útil para realizar otras determinaciones cuantitativas.

B) ACD (Ácido Cítrico-Dextrosa):

Tiene su principal aplicación en bancos de sangre pues preserva la sangre hasta por tres semanas y se puede transfundir sin toxicidad. En el laboratorio de hematología, se utiliza para preservar los antígenos de los eritrocitos cuando éstos se requieran estudiar.

Preparación:

Citrato disódico (monoácido).....2.0 g  
Dextrosa ..... 3.0 g  
Agua destilada (libre de pirógenos). .....20 ml

Se usa en proporción de 4 ml de sangre por uno de anticoagulante. La sangre así obtenida se conserva en refrigeración a 4<sup>0</sup> C.

VENTAJAS:

1. Conserva las células viables durante tres semanas.
2. No es tóxico, por lo que se puede transfundir.

DESVENTAJAS:

1. No es útil para la mayoría de los estudios hematológicos cuantitativos porque ocasiona gran dilución.

EDTA:

El Àcido Etilen Diamino Tetraacético se puede utilizar como sal disódica o tripotásica. Tiene una actividad anticoagulante muy intensa ya que impide que se ionice el calcio por quelación del mismo, además, conserva la morfología celular durante muchas horas, por lo que es el anticoagulante de mayor uso en hematología. La sal tripotásica es más soluble, razón por la se usa preferentemente. En los contadores automáticos, que cuentan plaquetas, también funciona mejor ya que no deja pequeñas partículas que puedan ser contadas como plaquetas.

Preparación:

EDTA (disódico o tripotásico)..... 2.0 g  
Agua destilada..... 100 ml

Se disuelve el EDTA en el agua, de preferencia 37 °C, y posteriormente se filtra; se deposita en tubos a razón de 0.1 ml de anticoagulante para 5 ml de sangre. Se puede evaporar a sequedad con lo que se evita totalmente la dilución de la muestra.

VENTAJAS:

1. Es muy barato.
2. Fácil de preparar.
3. Tiene gran poder anticoagulante, por lo que requieren bajas concentraciones.
4. Conserva excelentemente la morfología celular, hasta 24 horas después de obtenida la muestra.
5. Evita la aglutinación plaquetaria.
6. Se considera el mejor anticoagulante para la hematología habitual.
7. No afecta el VGM, y por lo tanto puede usarse para determinaciones de hemoglobina, hematocrito y recuentos globulares.

DESVENTAJAS:

Ninguna.

HEPARINA:

Es un anticoagulante natural de gran potencia, se considera el mejor para prevenir la hemólisis y las alteraciones morfológicas. Sin embargo, su uso se ha limitado debido a que su costo es significativamente mayor que los anticoagulantes artificiales. La heparina se puede obtener en sales de sodio, calcio o amonio.

Preparación:

Heparina..... 1000 UI/ml

Colocar en un tubo una gota de la solución de heparina y evaporar a sequedad. Esta cantidad es suficiente para anticoagular 7 ml de sangre.

Un método alternativo consiste en preparar la heparina con una jeringa y regresarla nuevamente al recipiente; la cantidad que queda impregnada en las paredes de la aguja es suficiente para 10 ml de sangre la heparina actúa inhibiendo la actividad de la trombina sobre el fibrinógeno, por lo tanto el mecanismo de acción de este anticoagulante lo hace distinto de los otros antes descritos.

VENTAJAS:

1. Tiene una gran actividad anticoagulante natural.
2. No ocasiona alteraciones morfológicas.
3. El plasma obtenido puede ser utilizado para otras pruebas bioquímicas.
4. Es ideal para gasometrías.

**DESVENTAJAS:**

1. Su costo es más elevado que el de los demás anticoagulantes.

**NOTA:**

Es importante mencionar que, aun con el mejor anticoagulante, se pueden tener errores que ocasionen defectos analíticos. Para minimizarlos, conviene tomar en cuenta lo siguiente:

1. Al obtener una muestra de sangre, hay que depositarla de inmediato en el tubo con anticoagulante y mezclarla perfectamente por inversión del tubo o mediante un mezclador mecánico rotatorio, nunca por agitación, que podría hemolizarla.
2. Lo extendidos sanguíneos deberán realizarse lo más pronto posible para evitar que la acción del anticoagulante provoque alteraciones morfológicas.
3. Si en un lapso de 24 horas no se realizaran las determinaciones analíticas, es conveniente refrigerar la muestra a 4 o 8<sup>o</sup>C.
4. Si se van a efectuar exámenes en plasma, es conveniente separarlo por centrifugación lo más pronto posible.

Actualmente, para la obtención de muestras se utiliza un sistema de tubos al vacío, que contienen el anticoagulante adecuado y que se identifican por el color del tapón:

<b>TAPÓN</b>	<b>ANTICOAGULANTE</b>
Lavanda	EDTA
Azul claro	Citrato de sodio
Negro	Oxalatos
Amarillo claro	ACD
Verde	Heparina
Rojo	Sin anticoagulante

FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA  
LABORATORIO DE HEMATOLOGÍA  
PRÁCTICA N.º 2  
“OBTENCIÓN DE MUESTRAS SANGUÍNEAS”  
**DURACION: 01 HR**

**OBJETIVO(S):**

El Alumno aprenderá a obtener correctamente muestras capilares y venosas, así como también la indicación de los métodos de obtención de dichas muestras.

**FUNDAMENTO:**

En todo laboratorio clínico, podemos afirmar que la calidad de un examen empieza con la calidad de la muestra. El de hematología no es la excepción, por lo que resulta fundamental conocer la metodología correcta para la obtención de las muestras, así como las ventajas, las desventajas, las indicaciones y los riesgos.

Para algunas determinaciones en las que se requiere una pequeña muestra es posible obtenerla mediante punción capilar, sin embargo, para la mayoría de exámenes, se utiliza la punción venosa por las razones que más adelante se mencionan.

Nunca debemos olvidar que todo el material que se use para obtener muestras debe ser estéril y desechable. Los riesgos importantes de transmisión de enfermedades, como hepatitis y SIDA, nos obligan a tomar estas medidas y a no poner al paciente en peligro de contaminación por reutilizar material, a pesar de que sea esterilizado. Por otro lado, es importante considerar las medidas de bioseguridad para evitar que nosotros nos podamos contaminar al obtener muestras de pacientes enfermos.

**GENERALIDADES:**

Los vasos sanguíneos que se acercan o se alejan de los capilares se vuelven progresivamente de diámetro mayor al acercarse al corazón. Las venas que abandonan inmediatamente a los capilares son las vénulas. Las vénulas tienen un diámetro de 20 a 200

µm y representan después de las lesiones traumáticas un sitio importante de actividad hemostática. Las vénulas están constituidas por endotelio y membrana basal rodeada por una capa de tejido conjuntivo extracelular con unos cuantos fibroblastos y células vasculares lisas integradas en su interior. El tejido conjuntivo contiene fibras de colágena del tipo I. En las venas más grandes hay unas cuantas fibras de elastina repartidas irregularmente, pero no están organizadas en una membrana. En algunas capas hay presencia de células cebadas. El flujo sanguíneo es lento en comparación con el de las arterias, pero las válvulas de las venas de tamaños mediano y grande evitan el flujo retrógrado y mantienen el flujo de la sangre hacia el corazón.

Las venas se originan en la punta de los dedos y las podemos dividir en:

- ❖ Venas de miembros superiores: comprenden un sistema de venas superficiales o subcutáneas, las cuales se encuentran situadas en el tejido celular subcutáneo inmediatamente por debajo de la piel y, en venas profundas o subaponeuróticas las que están a nivel muscular.

- ❖ Venas superficiales: se encuentran situadas en el tejido celular subcutáneo. Son más gruesas en los individuos cuyos músculos ejecutan contracciones más frecuentes y están menos desarrolladas en la mujer y en el niño. No son satélites de arteria alguna y presentan múltiples anastomosis con las venas profundas.

Las **venas superficiales de las manos** tienen su origen en la red venosa subungueal y en el plexo del pulpejo, cuyas pequeñas eferentes se reúnen en troncos cada vez más gruesos y terminan por formar las venas colaterales del dedo. Estas corren hacia el ángulo interdigital, y se anastomosan en su trayecto digital por medio de varios ramos transversales.

Las colaterales de los dedos convergen unas con otras. Las contiguas forman tres troncos que corresponden a los tres últimos espacios intermetacarpianos. Estos troncos, conocidos con el nombre de venas interóseas superficiales, se anastomosan entre sí por arcos transversales que constituyen en conjunto el arco venoso dorsal, el cual se halla situado hacia el límite del cuarto inferior con los tres cuartos superiores de los metacarpianos. La colateral interna del meñique, independiente de las otras, va a formar la vena sálvatela que más arriba se anastomosa con el arco venoso dorsal y forma el tronco de la vena cubital superficial. La colateral externa del índice y las colaterales del pulgar forman un tronco, origen de la vena cefálica del pulgar, que se anastomosa con la porción externa del arco dorsal para formar el origen de la vena radial superficial. Las venas dorsales de la mano reciben toda la circulación venosa de los dedos y las venas marginales de la red palmar. La red palmar, menos importante que la dorsal, se halla constituida por venas anastomosadas. Las de la región tenar se vierten en la cefálica del pulgar; las de la hipotenar, en la sálvatela, y las de la porción central de la palma convergen en la muñeca para formar la vena mediana del antebrazo.

Las **venas superficiales del antebrazo y del pliegue del codo** son tres: una mediana, otra lateral interna o cubital superficial y otra externa o radial superficial. La vena mediana recoge la sangre de la parte central de la red palmar y tiene su origen en la muñeca. Ascende luego verticalmente por la cara anterior del antebrazo hasta el pliegue del codo, donde se divide en dos ramas. La interna, llamada vena mediana basilica, corre por encima de la epitroclea y se anastomosa con la cubital superficial para formar la vena basilica. La externa, denominada mediana cefálica, se desliza por el borde externo del bíceps y a la altura del epicóndilo se une con la radial superficial para formar la vena cefálica. En ocasiones, la mediana en vez de bifurcarse, va a terminar a la cubital. Cuando se ramifica, del punto de bifurcación emana un ramo llamado vena perforante o comunicante del codo, que va unirse con el sistema venoso profundo.

La vena radial superficial nace por la unión del arco dorsal con la cefálica del pulgar. Ascende en primer lugar por el dorso del antebrazo y en su parte media rodea el borde externo pasando a la cara anterior. Corre por esta cara hasta el epicóndilo, donde se une con la mediana cefálica del brazo. Recibe ramos venosos del dorso del antebrazo.

La vena cubital superficial tiene su origen en la unión del arco dorsal con la sálvatela en el dorso de la muñeca. Da la vuelta por el borde interno del antebrazo en su tercio inferior, y se vuelve anterior; asciende luego hasta la epitroclea y termina por unirse con la mediana basilica para formar la basilica del brazo. En el pliegue del codo, las diversas venas

superficiales dibujan una M mayúscula, cuyas dos ramas centrales son dependencia de la mediana y cuyas ramas laterales están formadas por la radial y la cubital superficiales. La anastomosis de esta red superficial con sistema venoso profundo se realiza ya directamente a partir de la mediana, o bien partiendo de la mediana basilíca o de la mediana cefálica.

Las **venas superficiales del brazo** son la basilíca y la cefálica. La vena basilíca se halla constituida por la unión de la mediana basilíca con la cubital superficial y asciende a lo largo del borde interno del bíceps. En la parte media del brazo perfora la aponeurosis antebraquial y sigue ascendiendo por debajo de la aponeurosis acompañada de ramos del braquial cutáneo interno. Desemboca finalmente en la vena axilar o antes de llegar a ella, en las venas humerales. La vena cefálica tiene su origen en la unión de la mediana cefálica y de la radial superficial. Asciende a lo largo del borde externo del bíceps hasta la inserción inferior del deltoides, donde se dobla hacia dentro para seguir el surco deltopectoral, acompañada por la rama acromial de la arteria acromiotorácica. Una vez que ha alcanzado la fosita infraclavicular de Gerdy o la base del triángulo clavipectoral de Mohrenheim, perfora la aponeurosis correspondiente y va a desembocar a la ven axilar. Terminan en ella, durante su recorrido, venas del hombro, así como la vena acromiotorácica, y se anastomosa en todo su trayecto con la basilíca. Las venas superficiales del miembro superior son las venas primitivas del embrión, que posteriormente se unen con la circulación profunda. Las anastomosis se realizan sucesivamente por intermedio de la cefálica del pulgar y de las venas radiales profundas, por las perforantes interóseas o metacarpianas, por las comunicantes del carpo y por las comunicantes del codo.

Las **venas profundas de la mano, del antebrazo y del brazo** siguen el mismo trayecto de las arterias y tienen sus mismos límites y las mismas relaciones. Existen dos por cada arteria, a partir de la palma de la mano, donde se encuentran dos venas interóseas para cada arteria interósea, dos arcos venosos para cada arco arterial, dos radiales, dos cubitales y dos humerales. Solamente las colaterales de los dedos no son satélites de las arterias colaterales. La vena axilar tiene su origen en la unión de las dos venas humerales y de la basilíca. Corre por la región de la axilar hasta alcanzar la cara inferior de la clavícula, donde se continúa con la vena subclavia. Se relaciona con la arteria axilar por su cara externa, pero más tarde se halla colocada por delante de la arteria. Terminan en ella las venas acromiotorácicas, las torácicas inferiores, las escapulares inferiores y cuatro circunflejas que, a su vez, son satélites de las arterias homónimas, ramas de la arteria axilar, y recoge sangre del hombro. Se anastomosa, merced a las venas torácicas o mamarias externas, con las intercostales y con las venas epigástricas, originándose de este modo vías suplementarias para cuando los grandes troncos venosos se obstruyen. La vena subclavia es la prolongación de la axilar y corre desde la clavícula hasta la articulación esternoclavicular. En este lugar forma, al unirse con la yugular correspondiente, el tronco venoso braquicefálico. Todas las venas homónimas de las colaterales de la arteria subclavia desembocan, en cambio, en las yugulares y en el tronco venoso braquicefálico que junto con el tronco venoso del lado opuesto constituyen la vena cava superior que desemboca en la aurícula derecha del corazón.

❖ Venas de miembros superiores:

**Venas superficiales:** en la cara plantar existen numerosas venas superficiales dando la apariencia de una malla a la cual algunos autores le llaman suela venosa por que cubre toda la planta del pie. La malla poligonal converge hacia los espacios interdigitales y los bordes del pie, terminando por delante en arcos a nivel del origen de los dedos. En los bordes del pie, la red venosa termina por múltiples troncos que desembocan en la vena llamada marginal interna y externa, las cuales son de mayor calibre y tienen su recorrido a lo largo de la piel hasta llegar al calcáneo (hueso que está por debajo del tobillo). Las venas del dorso del pie constituyen el arco venoso dorsal, en cuya convexidad desembocan las venas dorsales de lo ortejo y las venas plantares que emanan de los bordes del pie. A partir de este momento se originan dos venas, la interna y la externa. Las venas dorsales externas, tienen su trayecto a lo largo del piel hasta llegar al cuello del pie, donde cada vena se va a unir con su marginal correspondiente con la unión de estas dos venas se forman otras dos más que son la safena interna y externa. La safena interna pasa por delante del maleolo interno y asciende por la cara interna de la pierna continuando su trayectoria por la cara anterior del muslo y el tercio superior perfora la aponeurosis para desembocar en una vena profunda denominada femoral. La vena safena externa asciende por la cara posterior de la pierna entre los dos músculos gemelos hacia el hueso poplíteo, donde perfora la aponeurosis y desemboca en una vena profunda denominada poplíteo y después una por cada arteria.

**Venas profundas:** en el pie y en la pierna existen dos venas profundas para cada arteria, siguiendo su mismo trayecto. Solamente la arteria poplíteo y la femoral se acompañan de una sola vena. La vena poplíteo tiene su trayecto a lo largo del hueso del mismo nombre y al salir de él se transforma en vena femoral, la cual da origen a la vena hiliaca primitiva externa. Con la unión de estas dos venas hiliacas se constituye la vena cava inferior que asciende por el lado derecho de la aorta, la cual se considera su satélite. Las venas que desembocan en la vena cava inferior son capsulares, renales, suprahepáticas, espermáticas y ováricas. La vena esplénica, mesentérica superior, mesentérica inferior y pancreática constituyen la vena porta, la cual llega al hígado y sale del mismo con la suprahepática.

La punción venosa es en la mayoría de los casos un procedimiento relativamente simple. Los hematomas o las equimosis suelen poner de manifiesto una técnica o criterio deficiente de la persona que la efectúa. Unas pocas palabras bien elegidas servirán para tranquilizar al enfermo. La autoconfianza y seguridad del técnico contribuirán a establecer la relación adecuada. El paciente debe estar en una posición confortable, con el brazo accesible al técnico. Los enfermos ambulatorios deben ser sentados cómodamente, con preferencia en una silla provista con un brazo que permita un apoyo firme. Hay que inspeccionar cuidadosamente las venas. Un torniquete hace las venas más prominentes y ayuda a eliminar las inaceptables pruebas a ciegas.

EQUIPO:

Ninguno

MATERIAL:

- a) biológico: Ninguno
- b) De laboratorio:

Torundas de algodón  
Lancetas estériles  
Tubos capilares con heparina  
Tubos capilares sin heparina  
Alcohol etílico al 70%  
Jeringas de 10 ml desechables, con aguja de 21x32 mm  
Tubos con anticoagulante  
Ligadura de látex  
Maneral y agujas Vacutainer desechables calibre 21x32 mm  
Tubos Vacutainer tapón lavanda (EDTA)  
Tubos Vacutainer tapón azul claro (Citrato de sodio)  
Gradilla

## TÉCNICA.

### **PUNCIÓN CAPILAR.**

La sangre de fluido directo es llamada comúnmente capilar o periférica y es la fluye después de efectuar una punción superficial cutánea, más apropiado sería llamarla sangre arteriolar. Esta punción se realiza cuando se requiere obtener cantidades muy pequeñas de sangre y la punción venosa resulta difícil. La metodología para realizarla es la siguiente:

1. Seleccionar el sitio adecuado: Los sitios más utilizados son: el lóbulo de oreja, la yema de un dedo y el talón. Este último es el de elección en recién nacidos. Es importante asegurarse del sitio elegido se encuentre tibio, para garantizar que los vasos sanguíneos se encuentren dilatados y la sangre fluya libremente, de lo contrario, se obtendrá muy poca sangre.
2. Asepsia: Usando una torunda de algodón impregnada con alcohol etílico al 70%, frotar perfectamente el sitio elegido para la punción mediante un barrido, sin pasar la torunda nuevamente por el mismo sitio. Con esto, se eliminan suciedad y detritus celulares y se evita la introducción de gérmenes al puncionar. Antes de hacer esto, dejar que el alcohol se evapore hasta sequedad.
3. Punción: Con una lanceta estéril y desechable, hacer la punción insertándola de un solo golpe en un ángulo de  $90^0$  y verificando que se introduzca hasta el tope. De esta manera, siempre se logra hacer una punción uniforme en profundidad y amplitud.
4. Obtención de la muestra: Desechar la primera gota de sangre que aparezca pues contiene líquido tisular y diluye la sangre. Dejar que la sangre fluya libremente y recogerla en un tubo capilar con o sin heparina, según sea necesario. No hacer presión del sitio de punción ya que con ello se ocasiona la salida del líquido intersticial. Existen en el mercado pequeños recipientes especiales para recibir la sangre capilar (microtainer BD), con y sin anticoagulante, que permiten manejar la muestra de mejor manera que con los tubos capilares. Una vez obtenida la sangre necesaria, se aplica en el lugar del pinchazo una torunda con alcohol, haciendo presión para evitar que siga sangrando.

#### VENTAJAS:

1. Gran facilidad para obtener pequeñas cantidades de sangre, aun en pacientes con venas difíciles.
2. Es la forma preferida para la realización de frotis sanguíneos.

#### DESVENTAJAS:

1. Sólo se obtiene una pequeña cantidad de sangre. Se requiere más muestra, es necesario volver a puncionar.
2. La muestra fácilmente se hemoliza.
3. Los valores obtenidos son diferentes a los de sangre venosa. Es necesario establecer los valores de referencia.
4. No se debe usar en pacientes con riesgo de infección, pues se favorecería con las punciones repetidas.

#### **PUNCIÓN VENOSA:**

Es la más utilizada para obtener muestras de sangre. Es una forma sencilla y adecuada para obtener la cantidad de sangre necesaria para realizar un gran número de pruebas, inclusive grandes cantidades que se pueden distribuir en varios tubos, de acuerdo a necesidades específicas. Las muestras de este tipo generalmente se obtienen por punción de una de las tres venas del pliegue del codo: Basílica, Cubital media y cefálica.

La metodología es la siguiente:

1. Preparación: Se informa al paciente del procedimiento que se realizará, con la finalidad de calmarlo. Una punción siempre genera un cierto grado de tensión nerviosa. El paciente debe estar sentado cómodamente o acostado.
2. Seleccionar el sitio adecuado: El más usado es la fosa antecubital, en la vena mediana cefálica, dado que es fácil de localizar y palpar en casi todos los pacientes, con excepción de los obesos. Sin embargo, si esto no es posible, es necesario buscar otro sitio para la punción. Algunas veces se tienen que utilizar las venas del dorso de la mano, pero es necesario tener un cuidado especial y experiencia para evitar la formación de hematomas alrededor de estos vasos móviles que carecen de fijación. En general, las venas deben examinarse y evaluarse; si son profundas y no logran palparse bien, no se debe intentar pincharlas, pues sería tanto como actuar a ciegas. Para realizar la punción en la yugular externa o en vasos profundos como yugular interna, humeral y femorales es necesario poseer mucha experiencia, por el riesgo que ello implica.
3. Asepsia: Usando una torunda de algodón impregnada con etanol al 70%, se frota perfectamente el sitio elegido para la punción mediante un barrido, sin pasar la torunda por el mismo sitio. Con esto, se eliminan suciedad y detritus celulares y se evita la introducción de gérmenes al puncionar. Antes de hacer esto, dejar que el alcohol se evapore hasta sequedad.
4. Torniquete: Mientras el alcohol se seca, se aplica un torniquete, unos 7 centímetros por encima del sitio de punción. No se debe dejar muy apretado pues se provocaría éstasis venosa que podría modificar los valores hemáticos. Desde luego que el torniquete no debe ser muy apretado, pues podría ser molesto para el paciente. Se invita al paciente a apretar el puño, con lo que favorece la fijación de la vena además de que la compresión muscular aumenta el flujo venoso con dilatación de las venas.

5. Venopunción: Se fija la vena en posición, sosteniendo el brazo del paciente con la mano mientras se estiran y comprimen los tejidos blandos situados justo debajo de donde se va a puncionar. Se toma la jeringa o el maneral del vacutainer y haciendo un ángulo de  $15^{\circ}$  con el brazo, se perfora la piel a lo largo de la cara lateral de la vena. Se hace avanzar la punta de la aguja debajo de la piel de 0.5 a 1 cm y luego se perfora la pared de la vena. La introducción se hace con suavidad pero con suficiente rapidez para reducir las molestias.

6. Obtención de la muestra: Si se utiliza una jeringa, se tira hacia atrás el émbolo de la jeringa de manera suave, lenta y uniforme a medida que la sangre va fluyendo. Se debe permitir el flujo de la sangre sin forzarlo, para evitar la hemólisis. Se utiliza un sistema de tubos al vacío, en cuanto la aguja haya penetrado la vena, se introduce un tubo en el maneral de sujeción, el que se mantiene fijo con la otra mano, hasta el tapón del tubo sea atravesado por la aguja situada dentro del maneral. Una vez que el tubo se llenó, se extrae y se repite la operación con tantos tubos como sea necesario. Se invita al paciente a abrir su puño. La aguja se retira en sentido inverso a como se introdujo también de manera suave pero con un solo movimiento. De inmediato, se coloca una torunda de algodón con alcohol en el sitio de la punción, ejerciendo presión sobre la zona y manteniéndola así por lo menos de 3 a 4 minutos para evitar la formación de hematomas. Recordar que éstos serán considerados testimonios elocuentes de la torpeza del operador.

7. Depósito e identificación de las muestras: Inmediatamente después de extraída la aguja, las muestras se deben depositar en los tubos necesarios, con o sin anticoagulante, retirando previamente la aguja y haciéndola resbalar suavemente por las paredes del tubo. De otra manera, se puede ocasionar hemólisis. En caso de haber usado sistema al vacío, la selección de éstos se hizo previamente. No olvidar que, en cuanto se deposite una muestra en un tubo con anticoagulante, es indispensable mezclarla por lo menos 5 minutos para garantizar una correcta anticoagulación. Asimismo, es de vital importancia la identificación inmediata y correcta de los tubos para evitar posibles confusiones de muestras que serían catastróficas.

8. Orden de extracción: Para evitar la activación de la coagulación con la consecuente alteración de las pruebas, así como la contaminación entre los diferentes aditivos de los tubos, se recomienda seguir el siguiente orden en la extracción de los tubos: citrato, heparina, EDTA, oxalato y finalmente tubos sin aditivo.

9. Desecho de la aguja: La aguja se desprende de la jeringa o maneral usando, de preferencia, un eliminador de agujas (BD), que al llenarse será esterilizado antes de ser eliminado en la basura. Si no se cuenta con éste, las agujas se deben depositar en una solución de hipoclorito de sodio para su inactivación. Para esto, con una pinza se retira la aguja y se deposita en la solución de hipoclorito de sodio al 10%. En ningún caso se debe tapar la aguja con su propio tapón usando una pinza e inmediatamente retirar ambas y depositarlas en un recipiente que posteriormente se incinerará. Recordar que las agujas mal manejadas o tiradas irresponsablemente pueden ser vía de transmisión de hepatitis o de SIDA.

#### VENTAJAS:

1. Se pueden obtener grandes cantidades de sangre con la mínima molestia.
2. Es posible hacer exámenes múltiples y repetidos con la misma muestra.
3. Las muestras no se hemolizan fácilmente cuando se obtienen de manera adecuada.
4. Los valores obtenidos son reproducibles y estandarizados.
5. Se puede utilizar en la mayoría de los pacientes.

#### DESVENTAJAS:

1. Difícil de ejecutar en pacientes que tienen venas muy delgadas.
2. La éstasis venosa prolongada provoca hemoconcentración.

#### PUNCIÓN ARTERIAL:

Para obtener una muestra de sangre arterial se punza una de las tres siguientes arterias: Braquial, Radial y Femoral. Este tipo de punción puede ser dolorosa e ir seguida de complicaciones. La mayor presión de la sangre arterial con respecto a la venosa hace el émbolo de la jeringa prácticamente se desplace por si mismo. Este tipo de punción se realiza en estudios de gases en sangre (gasometría).

#### NOTA:

No debemos olvidar que la obtención de la muestra es nuestra imagen ante el paciente, por ello, siempre lo debemos tratar con la debida consideración y respeto, tratando de ocasionarle las menores molestias posibles. Por otro lado, se insiste en que la calidad de un análisis clínico empieza en la muestra.

Actualmente, tiene una gran importancia la bioseguridad y ella implica la seguridad, tanto del paciente como del operador, en términos de transmisión de enfermedades. Todas las precauciones son indispensables para evitar contagios.

FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA  
LABORATORIO DE HEMATOLOGÍA  
PRÁCTICA NO. 3  
“PREPARACIÓN DE EXTENDIDOS SANGUÍNEOS”  
**DURACION: 01 HR**

**OBJETIVO(S):**

Que el alumno aprenda a realizar correctamente los extendidos sanguíneos usando diferentes técnicas

**FUNDAMENTO:**

El examen microscópico de una extensión de sangre periférica, sobre un porta o cubreobjetos de vidrio, nos permite obtener una valiosa información acerca de los elementos formes de la sangre, muchos de los cuales no puede ser evaluados mediante las mediciones cuantitativas realizadas por otros métodos. En general, en un frotis podemos evaluar lo siguiente:

- a) Morfología eritrocitaria.
- b) Concentración y distribución de hemoglobina.
- c) Distribución de los eritrocitos.
- d) Inclusiones y artificios de los eritrocitos.
- e) Morfología y recuento diferencial de los leucocitos.
- f) Inclusiones y artificios de los leucocitos.
- g) Morfología y apreciación cualitativa del número de plaquetas.
- h) Artificios y agrupación de plaquetas.

Por lo anterior, se considera que la preparación de un extendido de sangre periférica es una técnica fundamental en hematología. Todo profesional del laboratorio clínico debe ser capaz de realizar preparaciones excelentes sin conformarse con resultados mediocres, ya que para observar adecuadamente la morfología sanguínea se necesita tener preparaciones de calidad.

**GENERALIDADES:**

El examen morfológico de las células hematopoyéticas con el microscopio de luz requiere la preparación de un frotis de sangre, bien teñido, y la precisión de la evaluación morfológica depende, en parte de su calidad. En la preparación de un frotis de sangre se coloca una gota de sangre venosa o capilar con anticoagulante EDTA, en un extremo de un portaobjetos de vidrio. Un segundo portaobjetos para extenderla, que es más estrecho que el portaobjetos de vidrio del microscopio, se coloca sobre la gota de sangre y se permite que ésta se propague en toda su anchura; debe hacer un ángulo de 45° entre el portaobjetos de esparcimiento y el del microscopio. En un movimiento controlado, se tira de la sangre a lo largo del portaobjetos de vidrio del microscopio y el frotis de sangre se seca de inmediato mediante el agitado suave del portaobjetos. La falla en el secado del frotis de sangre en un tiempo oportuno da lugar a artificios de contracción de las células, especialmente por el aumento de la humedad.

Un frotis de sangre óptimo tiene las siguientes características:

- ❖ Longitud mínima de 2.5 cm
- ❖ Transición gradual de un frotis grueso a uno delgado
- ❖ Borde cuadrado o recto
- ❖ Márgenes lisos y continuos
- ❖ Márgenes más estrechos que el portaobjetos del microscopio
- ❖ Ausencia de estrías, ondas o interrupciones

La presencia de ciertos trastornos fisiológicos, como anemia, policitemia, mieloma múltiple y enfermedad de aglutininas frías da lugar a frotis los cuales son menos óptimos. El espesor o delgadez del frotis de sangre puede ser regulado al ajustar la cantidad de sangre de la gota, al modificar la velocidad con la cual se esparce, o al cambiar el ángulo en el cual se coloca el portaobjetos de esparcimiento.

El examen de un frotis de sangre periférica bien teñido es una de las pruebas solicitadas con mayor frecuencia en el laboratorio de hematología. El examen minucioso de un frotis de sangre periférica se puede usar: 1) como instrumento de detección para identificar una enfermedad, 2) para diagnóstico definitivo de ciertos trastornos hemáticos y no hemáticos, y 3) para vigilar la respuesta del paciente al tratamiento. El examen del frotis de sangre periférica incluye: un estimado de los leucocitos totales; la observación de la presencia de células anormales, de la distribución anormal de eritrocitos y de la morfología de los eritrocitos y las plaquetas; un estimado de plaquetas totales, y un conteo diferencial de 100 células de leucocitos.

Con el aumento 100 x se rastrea el frotis de sangre periférica para asegurar una distribución regular de leucocitos y observar células inmaduras o anormales, agrupamientos de plaquetas y patrones anormales, agrupamiento de plaquetas y patrones anormales de distribución de los eritrocitos como pilas de monedas o aglutinación. El estimado de leucocitos se obtiene al contar el número de leucocitos en cada cinco campos visuales, determinar el número promedio de leucocitos dentro de estos cinco campos y multiplicar ese número por 200. El estimado de leucocitos debe correlacionarse con su conteo.

Con el aumento de 1000 se observa la morfología de las plaquetas, se obtiene un estimado de las plaquetas al contar el número de éstas en 5 a 10 campos visuales, se determina su número promedio dentro de estos campos y se multiplica este número por el factor de conversión apropiado. El estimado de plaquetas debe correlacionarse con su conteo. La morfología del eritrocito se evalúa por medio de una observación cuidadosa de su tamaño, forma, color y presencia de inclusiones. Los eritrocitos normales se describen como normocitos y normocrómicos. Cualquier cambio más allá de las variaciones normales debe anotarse, ya que ciertas variaciones son características de trastornos hemáticos específicos. El conteo diferencial de los leucocitos se practica al contar 100 células por preparación con el uso de un método de seguimiento de muralla para realizar el examen. Cada leucocito encontrado debe identificarse y colocarse en la categoría apropiada; las células distorsionadas solo se incluyen si son claramente identificables. Los eritrocitos nucleados no se incluyen dentro del diferencial, pero se cuentan por separado. Las alteraciones morfológicas pueden resultar de un trastorno

hemático subyacente, exceso de anticoagulante o de falta de preparación de los frotis de sangre dentro de las cuatro horas posteriores a la colección. Las alteraciones anticoagulantes clásicas incluyen: vacuolización citoplásmica, desgranulación, cariorrexis, cariólisis y cambios en la forma nuclear.

En un frotis de sangre teñido por Romanowsky, el eritrocito aparece como un disco 7  $\mu\text{m}$  con área central de palidez que está rodeada por un reborde de hemoglobina teñido de rosa. El área de palidez se produce por la cercanía entre las dos porciones cóncavas de la membrana cuando la célula se aplana sobre un portaobjetos de vidrio. Por lo regular, el área de palidez ocupa cerca de la tercera parte del diámetro de la célula. Esta área no se aprecia en los eritrocitos suspendidos en solución salina o en plasma vistos con el microscopio de luz. La morfología normal del eritrocito se llega a modificar por varios trastornos patológicos intrínsecos o extrínsecos de la célula. *El examen cuidadoso de un frotis de sangre teñido revelará estas aberraciones morfológicas: Poiquilocitosis, anisocitosis, equinocitos, estomatocitos, esferocitos, esquistocitos, leptocitos, codocitos, dacriocitos, drepanocitos, eliptocitos, queratocitos, anisocitos, macrocitos, microcitos, células hipocráticas, eritrocitos policromatófilicos, inclusiones de los eritrocitos.*

**Tinciones de sangre:** los colorantes de anilina, ampliamente usados en los estudios de la sangre, son de dos tipos generales; los básicos, como el azul de metileno, y los ácidos como la eosina. Los núcleos y algunas otras estructuras de la sangre se tiñen con los básicos, por lo que se denominan basófilos. Ciertas estructuras sólo toman los colorantes ácidos y se llaman acidófilas o eosinófilas. Otras estructuras se tiñen por una combinación de ambos y se denominan neutrófilas. El azul de metileno policromo y la eosina son las tinciones derivadas del método de Romanowsky original y se utilizan ampliamente. Tienen diferencialmente la mayoría de las estructuras normales y anormales de la sangre. Los componentes básicos de los colorantes de tipo Romanowsky son las tiacinas, mientras que los componentes acídicos son eosinas; esta clase de colorantes se conoce, por tanto, por la designación de eosinatos de tiacina. Las tiacinas consisten en azul de metileno y diversas proporciones de sus análogos producidos por desmetilación oxidativa: azur B; azur A; dimetiltionina simétrica y azur C. El componente acídico, eosina, se deriva de un esqueleto de xanteno. Muchas tinciones de Romanowsky se disuelven en alcohol metílico y combinan la fijación con la tinción. Entre los métodos más conocidos se encuentran los de Giemsa y Wright.

El proceso de tinción empieza con el paso de fijación con metanol que resulta en la adherencia de las proteínas celulares al portaobjetos de vidrio y evita que las células se deslaven durante los pasos subsecuentes. La fijación adicional se realiza cuando el frotis de sangre cubre con el colorante de Wright. La tinción efectiva se inicia con la adición de un amortiguador al colorante de Wright que da lugar a la ionización de los colorantes. Después del tiempo de tinción apropiado, se enjuaga copiosamente el frotis de sangre con agua destilada y se permite su secado al aire. Un frotis de sangre teñido de manera apropiada satisface los siguientes criterios:

<b>Criterios para un frotis de sangre teñido apropiadamente</b>	
<b>Evaluación microscópica</b> <b>Evaluación microscópica</b>	<p>El frotis de sangre es de color azul rosado</p> <p>Las células sanguíneas están distribuidas de manera regular.</p> <p>Las porciones entre las células son claras</p> <p>Los eritrocitos son de color rojo naranja</p> <p>Los gránulos neutrófilos son de color lila</p> <p>Los gránulos eosinófilos son de color rojo naranja</p> <p>Los gránulos basófilos son de color azul oscuro o morado</p> <p>El citoplasma de los linfocitos es de color azul huevo de petirrojo</p> <p>Los núcleos de los leucocitos son de color azul a morado</p> <p>Dentro de los núcleos se distinguen la cromatina y la paracromatina</p> <p>En la tinción el precipitado del colorante es mínimo o está ausente.</p>

<b>Causas potenciales de frotis de sangre teñidos de manera inapropiada</b>	
<b>Si el frotis de sangre es:</b> <b>Excesivamente azul u oscuro</b>	<b>Causas potenciales</b> Tinción prolongada Lavado inadecuado Alcalinidad demasiado alta del colorante o del amortiguador o ambos
<b>Excesivamente rosado o claro</b>	Frotis de sangre grueso Tinción insuficiente Lavado prolongado Acidez demasiado alta del colorante o del amortiguador, o ambos
<b>Hay presencia de precipitado</b>	Portaobjetos no limpios Desecación durante el proceso de tinción Filtrado inadecuado del colorante

Es crítico obtener una muestra medular adecuada. Los mejores frotis por aspiración se realizan tomando varias partículas medulares de la muestra y dispersándolas sobre los portaobjetos o seguido de cubreobjetos, tinción de Wright y Giemsa. Con una buena preparación se pueden observar tanto la estructura de las partículas del estoma como la morfología de los tipos individuales de células.

EQUIPO.  
Ninguno

#### MATERIAL:

- a) Biológico. Sangre venosa obtenida con EDTA.
- b) De laboratorio:
  - Portaobjetos
  - Cubreobjetos

#### TÉCNICA PARA EXTENDIDOS SANGUÍNEOS EN CUBREOBJETOS:

Esta técnica se prefiere para obtener la mejor definición y distribución celular posible. Se realiza de la siguiente manera:

1. Colocar en el centro del cubreobjetos una gota de sangre de unos 2 mm de diámetro, aprox.
2. Inmediatamente, colocar un segundo cubreobjetos sobre el primero, en una posición rotada de  $90^0$  respecto al primero, de tal modo que los ángulos puedan ser fácilmente cogidos entre los dedos pulgar e índice de la mano libre. Los dos cubreobjetos estarán formando una “estrella de ocho picos”. Véase figura 1.
3. La sangre se extenderá de inmediato como una delgada película uniforme; enseguida que ha dejado de extenderse, los cubreobjetos se separan suavemente por un movimiento de deslizamiento en el mismo plano, sin separar las superficies. Si no se eleva ningún cubreobjetos, aparecerá una fina y uniforme extensión de sangre en cada uno de ellos. El grosor de la extensión dependerá únicamente de la cantidad de sangre aplicada, por lo que es muy importante calcularla bien.
4. Secar de inmediato soplando vigorosamente con un pedazo de cartón o una secadora eléctrica.
5. Identificar la preparación.

#### VENTAJAS:

1. Se obtiene una distribución celular uniforme.
2. Los frotis tienen gran definición.
3. Se pueden montar 2 ó 3 en un portaobjetos, para su lectura.

#### DESVENTAJAS:

1. Son difíciles de rotular.
2. Es difícil manipularlos.
3. Se rompen con facilidad.
4. Su conservación es problemática.
5. El proceso de tinción es difícil.

#### TÉCNICA PARA EXTENDIDOS SANGUÍNEOS EN PORTAOBJETOS:

**FROTIS LONGITUDINAL:** Estas extensiones son preferidas a las anteriores porque son más fáciles de manipular, se rompen menos, se rotulan con facilidad y no requieren montaje. La manera de hacerlas es la siguiente:

1. Colocar una gota de sangre de 2 a 3 mm de diámetro a 1 ó 2 centímetros del borde del portaobjetos, colocando éste en posición horizontal sobre la mesa de trabajo.

2. Colocar un segundo portaobjetos (extensor) de modo que forme un ángulo de  $30^0$  con el portaobjetos horizontal, con su eje mayor paralelo a él. El borde más abajo del portaobjetos extensor, que debe ser liso y regular, se aplica firmemente sobre la superficie del primero, de manera que la gota de sangre esté por debajo de él. Entonces, el segundo portaobjetos se desliza lentamente hacia la sangre hasta que se produzca el contacto, después del cual la sangre se deslizará uniformemente entre la superficie de contacto de ambos portaobjetos.
3. El portaobjetos extensor es movido rápida y suavemente en dirección opuesta, manteniendo el contacto y el ángulo entre los dos portaobjetos. La extensión formada debe ser uniforme y de aproximadamente la mitad de la longitud de la laminilla. El grosor de la extensión y del ángulo en que se sitúa éste: a mayor ángulo mayor grosor, a mayor velocidad, menor grosor. Ver figura 2.
4. Una vez que la sangre se ha extendido, se procede a secar rápidamente el frotis, soplando vigorosamente con un cartón o usando una secadora eléctrica. Esto se hace con la finalidad de evitar el apilamiento de los eritrocitos (Rouleaux) y de que los leucocitos permanezcan extendidos sobre el portaobjetos, de lo contrario, tienden a regresar a su forma original dificultando su observación. Nunca se debe secar soplando con la boca pues el aire húmedo ocasionaría alteraciones morfológicas.

#### VENTAJAS:

1. Son fáciles de manipular, teñir y rotular.
2. Son los más sencillos de realizar.
3. Su conservación es sencilla.
4. Son muy útiles para examinar eritrocitos.

#### DESVENTAJAS:

1. La distribución de leucocitos no es homogénea pues las células más grandes, como polimorfonucleares y monocitos, tienden a acumularse cerca de los extremos.

#### FROTIS TRANSVERSAL:

Son similares a los anteriores, con la ventaja de que la distribución de las células es homogénea. Se realizan de la siguiente forma:

1. Colocar una gota de sangre de 2 a 3 mm de diámetro en la parte media y cerca del extremo largo de un portaobjetos. Mantenerlo en posición horizontal sujetándolo con los dedos índice y pulgar de manera que se forme un “puente” con estos dedos sobre el portaobjetos. Ver figura 3.
2. Se coloca un segundo portaobjetos (extensor) haciendo un ángulo de  $30^0$  con el primero y con su eje mayor perpendicular al portaobjetos horizontal, quedando la gota de sangre debajo de él y apoyándolo firmemente. Se desliza el extensor hasta hacer contacto con la sangre, la que difunde uniformemente en la superficie de contacto.
3. El portaobjetos extensor se mueve en dirección opuesta hasta llegar al extremo contrario a aquel en el que se depositó la gota de sangre. En este momento, se deja descansar sobre el horizontal formando los dos portaobjetos una T. Soltar unos segundos el extensor para que la sangre se difunda uniformemente, entre ambas superficies, en una capa fina.

4. Cuando la sangre termine de extenderse, se separan los portaobjetos mediante un rápido movimiento, deslizándolos en el mismo plano horizontal y teniendo cuidado de no elevar ni separar ninguno de los portaobjetos.
5. Secar inmediatamente el frotis en la forma descrita previamente.
6. Identificar la preparación.

#### VENTAJAS:

1. Fáciles de manipular, teñir y rotular.
2. Su conservación es sencilla.
3. Se obtiene una excelente distribución de eritrocitos, leucocitos y plaquetas.

#### DESVENTAJAS:

1. Es relativamente más difícil dominar la técnica.

#### NOTA:

Para lograr frotis excelentes, es indispensable que los cubreobjetos o portaobjetos se encuentren perfectamente limpios y libres de grasa. Es importante recordar que cuando se practica una extensión de sangre, se produce un trauma mecánico en las células durante el proceso. Además, las células, al ser extendidas, se aplanan sobre la laminilla, permaneciendo así cuando se seca inmediatamente. El proceso de tinción puede ocasionar artificios que hay que considerar cuando se valore la extensión. No olvidar que se debe utilizar sangre recientemente extraída, ya que el anticoagulante puede ocasionar alteraciones morfológicas.

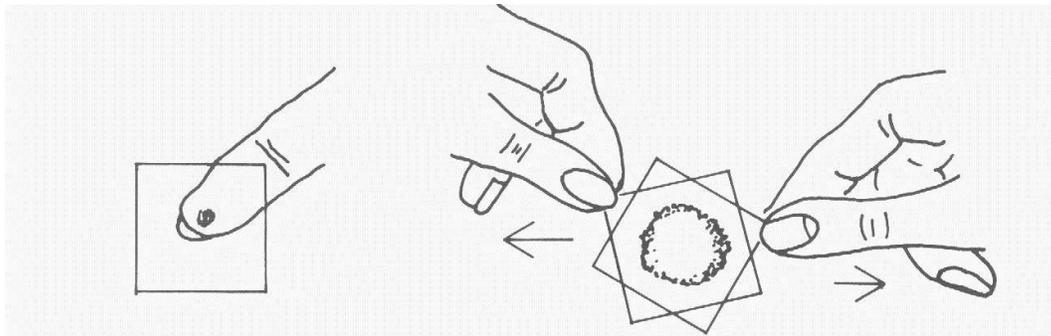


Fig. 1. Frotis en cubreobjetos.

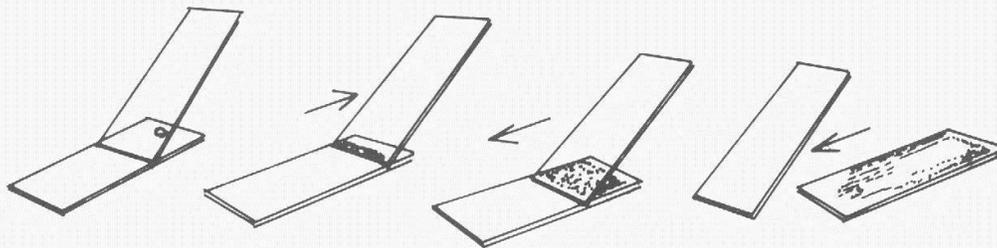


Fig. 2. Frotis en portaobjetos (longitudinal).

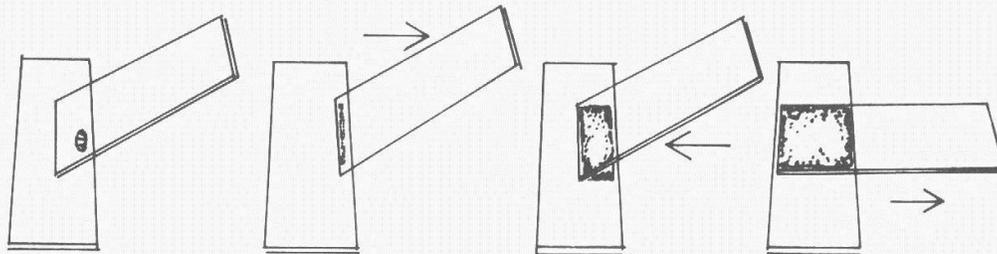


Fig. 3. Frotis en portaobjetos (transversal).

Iovine, E y A.A Selva (1990). “**El Laboratorio en la Clínica**” 4<sup>a</sup> edición. Editorial Panamericana. Buenos Aires, Argentina.

FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA  
LABORATORIO DE HEMATOLOGÍA  
PRÁCTICA N.º 4  
“ERITROSEDIMENTACIÓN (VELOCIDAD DE SEDIMENTACIÓN GLOBULAR)”  
**DURACION: 01 HR**

**OBJETIVO(S):**

Que el alumno determine la velocidad de sedimentación globular en muestras de sangre, así como también su utilidad clínica.

**FUNDAMENTO:**

Si se obtiene una muestra de sangre con anticoagulante y se deja en reposo en un tubo de ensayo, en posición vertical, los eritrocitos se depositarán gradualmente en el fondo. No todas las muestras de sangre sedimentan con la misma velocidad, lo que depende de varios factores como el tamaño de los eritrocitos, la densidad y viscosidad del plasma, estas últimas influidas por las concentraciones de proteínas. Con frecuencia, los eritrocitos se repelen entre sí debido a la presencia de ácido siálico en su superficie, que tiene carga eléctrica negativa. El aumento de proteínas, sobre todo de gran peso molecular, disminuye la fuerza repelente entre los eritrocitos, permitiendo que se aglutinen (fenómeno de Rouleaux). Cuando esto sucede, los eritrocitos aglutinados presentan un mayor volumen, por lo que sedimentan a mayor velocidad.

La velocidad a la que sedimentan los eritrocitos la medimos en condiciones estandarizadas, corrigiendo con las posibles variaciones dadas por los cambios en el hematócrito.

**GENERALIDADES:**

Los niveles elevados de fibrinógeno y, en menor medida de alfa, beta y gammaglobulinas favorecen una VSG acelerada. Estas moléculas asimétricas de proteína tienen un efecto mayor que otras proteínas respecto a la disminución de la carga negativa de los eritrocitos (potencial zeta) que tiende a mantenerlos apartados. La disminución de este potencial promueve la formación de apilamientos que sedimentan más rápidamente que las células aisladas. La eliminación del fibrinógeno absoluta entre VSG y cualquiera de las fracciones proteicas del plasma. La albúmina y lecitina retrasan la sedimentación y el colesterol la acelera.

La *anemia* es responsable de una mayor VSG, ya que la variación de la relación eritrocito-plasma favorece la formación de apilamientos, independientemente de las variaciones en la concentración de proteínas plasmáticas. En cualquier método de determinación, la VSG es muy sensible a las proteínas plasmáticas alteradas en el intervalo de valores del hematócrito de 0.30 a 0.40. La velocidad de sedimentación es directamente proporcional al peso del agregado celular e inversamente proporcional al área superficial. Los microcitos se sedimentan con mayor lentitud que los macrocitos, que tienen un área superficial disminuida en relación con el volumen. Las pilas de monedas también tienen un área superficial disminuida con relación al volumen y aceleran la VSG. Los hematíes con forma anormal o irregular, tales como las células falciformes o los esferocitos, dificultan la formación de pilas y disminuyen la VSG.

Se pueden observar 3 fases:

- 1) En los primeros 10 min hay poca sedimentación en forma de pilas;
- 2) durante 40 min aproximadamente, la sedimentación se reduce a una velocidad constante, y
- 3) La sedimentación se retrasa en los 10 min finales a medida que las células se apilan en la parte inferior del tubo.

El valor de la VSG puede estar elevado si la concentración del anticoagulante es mayor de lo recomendado. El citrato sódico o el EDTA no afectan la VSG si se utilizan en la concentración adecuada. Sin embargo, la heparina altera el potencial zeta de la membrana y no puede utilizarse como anticoagulante. La presencia de burbujas en el tubo, cuando se llena, afectará la VSG. La hemólisis puede modificar la sedimentación. La limpieza del tubo es importante, y se deben eliminar todos los restos de alcohol y éter. La inclinación del tubo acelera la VSG. Los eritrocitos se agregan a lo largo del lado inferior, mientras que el plasma aumenta por el superior. En consecuencia, la influencia retardadora del plasma ascendente es menos efectiva. Por todo ello, una desviación de solo 3° a partir de la vertical puede acelerar el valor de la VSG en hasta un 30%. La temperatura debería mantenerse entre 20 y 25° C ya que las temperaturas inferiores o superiores en algunos casos alteran la VSG. Si la sangre se ha guardado refrigerada, se debería llevar a temperatura ambiente antes de realizar la prueba. La prueba debería prepararse antes de 2 horas después de haber obtenido la muestra de sangre; de lo contrario, algunas muestras con VSG elevada darán valores falsamente bajos. Con el tiempo, los eritrocitos tienden a adoptar una forma esférica con menor inclinación a formar apilamientos.

El valor de la VSG se usa para demostrar la presencia de *inflamación o destrucción tisular, o ambas afecciones*. Es una prueba “no específica” que indica destrucción de tejido, pero no identifica la causa (o sea el trastorno patológico responsable).

### ***Trastornos vinculados con aumento de la VSG***

Padecimientos inflamatorios con aumento de reactantes de fase aguda

Lupus eritematoso sistémico

Artritis reumatoide

Infecciones agudas y crónicas

Tuberculosis pulmonar

Endocarditis bacteriana subaguda

Fiebre reumática

Hepatitis

Infarto al miocardio

Mieloma múltiple

Macroglobulinemia de Waldenstrom

Embarazo

Menstruación

Anticonceptivos orales

En la *enfermedad de Hodking*, la VSG puede ser una determinación pronóstica de mucha utilidad en ausencia de síntomas sistémicos (fiebre, pérdida ponderal, diaforesis nocturna). En un estudio un tercio de los pacientes asintomáticos presentaban una VSG inferior a 10 mm/hora y una excelente tasa de supervivencia, independientemente de la edad, el estadio y la histopatología. Los pacientes asintomáticos con una VSG de 60 mm/hora o más tenían una tasa de supervivencia tan mala como los enfermos con síntomas sistémicos.

#### EQUIPO:

Gradilla de Wintrobe

#### MATERIAL:

- a) Biológico. Sangre obtenida con EDTA.
- b) De laboratorio: Gradilla  
Cronómetro  
Pipetas Pasteur de punta larga con bulbo.  
Tubos de Wintrobe.

#### TÉCNICA:

1. Mezclar la sangre por inversión por lo menos durante 5 minutos.
2. Llenar un tubo de Wintrobe hasta la marca 0-10 usando una pipeta Pasteur. Es importante vigilar que no se formen burbujas en la columna de sangre o en el fondo del tubo al llenarlo. Esto se logra haciendo resbalar la sangre por las paredes del tubo, iniciando en el fondo y sacando la punta de la pipeta a medida que se va llenando.
3. Colocar el tubo en la gradilla de Wintrobe, verificando que ésta se encuentre bien nivelada.
4. Dejar en reposo en una mesa sin vibraciones, durante 60 minutos.
5. Leer la altura de la interfase plasma/eritrocitos y anotar la cifra.
6. Centrifugar el tubo durante 30 minutos a 3000 r.p.m. para obtener el hematócrito.
7. Corregir la lectura de la eritrosedimentación con el hematócrito usando la tabla de Wintrobe-Landsberg. Ver figura 4.

#### INTERVALOS DE REFERENCIA:

Mujeres .....0-13 mm/hora  
Hombres .....0-5 mm/hora  
Niños .....1-15 mm/hora

#### NOTA:

Aunque la prueba no es específica para ninguna patología en especial, se utiliza como un índice de presencia de proceso inflamatorio agudo. Sin embargo, su normalidad no excluye la posibilidad de enfermedad.

Es necesario realizar la prueba dentro de las primeras tres horas después de obtenida la sangre. Es importante verificar la verticalidad del tubo durante la prueba, pues, su inclinación conduce a resultados erróneos.

## CORRECCIÓN DE LA VELOCIDAD DE SEDIMENTACIÓN GLOBULAR

1. Se busca la línea horizontal correspondiente a los mm de sedimentación.
2. Se sigue la línea hasta interceptar la vertical correspondiente al Hto.
3. Desde este punto se sigue la línea curva más próxima hacia abajo hasta cruzar la línea triple del 42 si es mujer y del 47 si es hombre.
4. Este punto de intersección leído sobre la línea horizontal representa la velocidad de sedimentación corregida.

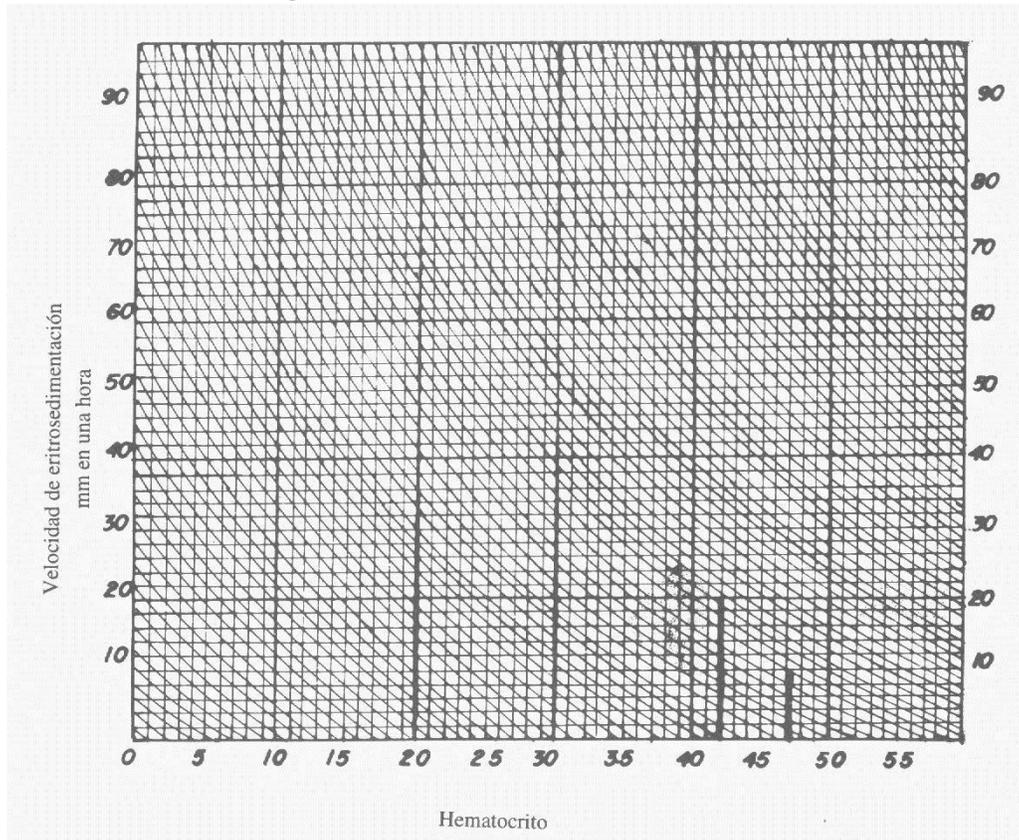
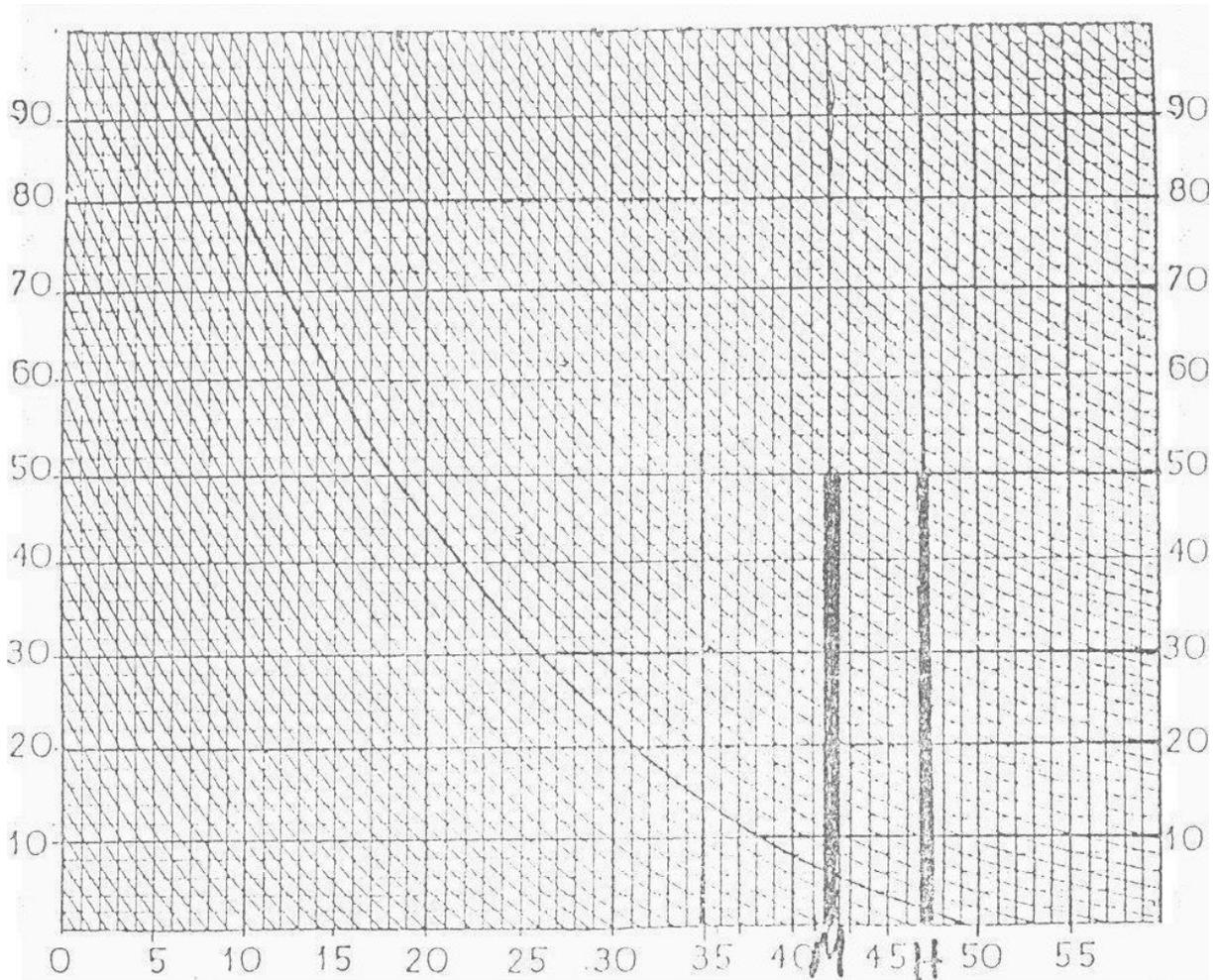


Figura 4

Iovine, E y A.A Selva (1990). “**El Laboratorio en la Clínica**” 4<sup>a</sup> edición. Editorial Panamericana. Buenos Aires, Argentina.



Iovine, E y A.A Selva (1990). “El Laboratorio en la Clínica” 4ª edición. Editorial Panamericana. Buenos Aires, Argentina.

FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA  
LABORATORIO DE HEMATOLOGÍA  
PRÁCTICA N.º 5  
“DETERMINACIÓN DEL HEMATÓCRITO”  
**DURACION: 01 HR**

**OBJETIVO(S):**

Que el alumno aprenda a ejecutar correctamente la determinación del hematócrito usando macro y micrométodo. Así como también la importancia y utilidad clínica de dicha prueba.

**FUNDAMENTO:**

El hematócrito o volumen globular porcentual mide el porcentaje del volumen total de sangre ocupado por glóbulos rojos. Su determinación se basa en la separación de los eritrocitos y el plasma mediante una centrifugación capaz de “empacar” a los hematíes en el menor volumen posible; éste será llevado a 100% con el total de sangre, por lo que el resultado se expresará como un porcentaje. El volumen del plasma que queda atrapado entre las células debe ser el menor posible, para evitar mediciones erróneas. Es obvio que el anticoagulante utilizado para realizar esta determinación es capaz de mantener inalterado el volumen eritrocitario.

**GENERALIDADES:**

El hematócrito es una de las pruebas de laboratorio más simples y más reproducibles. El hematócrito es útil en la detección *de anemia y policitemia*, y junto con el número total de eritrocitos y la determinación de la hemoglobina, se usa para calcular los índices eritrocitarios, volumen corpuscular medio (VCM) y concentración de la hemoglobina corpuscular media (CHCM).

El hematócrito se expresa como porcentaje o, preferiblemente, una fracción decimal. Las unidades (L/L) están implícitas. El hematócrito venoso coincide estrechamente con el obtenido por punción cutánea; ambos son mayores que el hematócrito corporal total.

El hematócrito refleja la concentración de eritrocitos, no su masa total. Es bajo en la hidremia del embarazo, pero la cifra total de eritrocitos circulantes no está reducida. El hematócrito puede ser normal o incluso elevado en el shock acompañado por hemoconcentración, aunque la masa total de eritrocitos puede estar considerablemente disminuida debido a la pérdida de sangre. No es fiable como estimación de anemia inmediatamente después de la pérdida de sangre, aunque sea moderada, o de una transfusión.

Una duración y velocidad de centrifugación adecuadas son esenciales para el hematócrito correcto. Los eritrocitos deben estar concentrados, ya que una centrifugación adicional no reduce valores del hematócrito. En general, cuanto más alto es el hematócrito, mayor fuerza de centrifugación requiere. A causa del menor tiempo necesario para la centrifugación y del menor error debido al atrapamiento del plasma, se prefiere el micrométodo al macrométodo. El incremento del hematócrito debido al plasma atrapado es algo mayor que el debido a los leucocitos y plaquetas.

La posición, la actividad muscular y la éstasis debida a un torniquete mantenido pueden provocar el mismo orden de alteraciones en el hematócrito y concentraciones celulares que en el caso de los constituyentes solubles no filtrables. Un error exclusivo para el hematócrito es el debido a exceso de EDTA ; el hematócrito será falsamente bajo debido a la concentración celular, mientras que la hemoglobina y los recuentos celulares no se verán afectados.

Los errores técnicos incluyen la mezcla deficiente de la sangre antes de obtener la muestra, una lectura inadecuada del nivel de células y plasma, y la inclusión del extracto leucocitario como parte del volumen eritrocítico. La irregularidad del diámetro interior de los tubos puede conducir también a un hematócrito inadecuado.

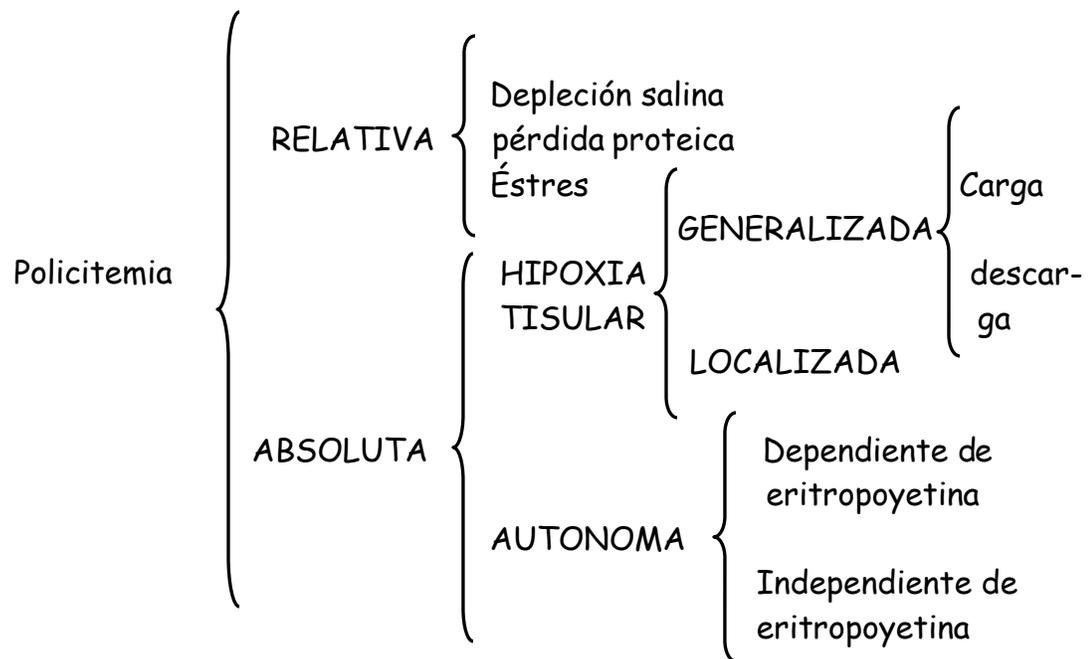
**ANEMIA:** El paciente que presenta anemia leve sin ninguna otra alteración, por lo general, es asintomático; aunque puede presentarse con un aumento ligero de disnea, palpitaciones y sudación que en forma ordinaria acompañan al ejercicio, conforme la anemia se vuelve más grave estos síntomas son más importantes y se reduce la capacidad para trabajar. Cuando la alteración es grave se relaciona con disnea importante, palpitaciones y cefalea pulsátil durante el ejercicio. Otros signos y síntomas que parecen tener bases fisiológicas incluyen:

- 1) retención de sodio suficiente para producir edema en zonas declives,
- 2) pérdida del apetito e indigestión secundaria al suministro insuficiente de oxígeno al intestino
- 3) debilidad generalizada, mareo y en ocasiones síncope relacionado con regulación vasomotora comprometida y
- 4) síntomas por hipoxia del sistema nervioso central que consisten en insomnio, incapacidad para concentrarse e incluso desorientación.

En la exploración física, el dato más directo de anemia es la palidez, debido a que hay una relación general entre el color de piel y mucosas, y la concentración de hemoglobina.

**POLICITEMIA:** La probabilidad de que un paciente tenga un incremento en la masa eritrocitaria está en función de que tanto rebasa la hemoglobina o el hematócrito los valores normales esperados. La policitemia al igual que la hipertensión produce algunos síntomas importantes. Cuando la concentración de hemoglobina excede de 18 g/dl (hematócrito por arriba de 54%), aumenta la viscosidad de la sangre entera, en especial donde la velocidad del flujo es baja como en la microvasculatura. Esto representa un peligro para la oxigenación tisular. La circulación cerebral y el suministro de oxígeno se afectan en forma importante, y las concentraciones de lactato en los individuos que hacen ejercicio aumentan de manera inadecuada. Esto es cierto incluso en pacientes con policitemia relativa, en los cuales el incremento en el hematócrito sólo se debe a reducción en el volumen plasmático. Los pacientes refieren cefalea, malestar general y fatiga fácil. También pueden presentar hipertensión leve. No siempre es claro si los síntomas se relacionan con el incremento de la viscosidad o con el trastorno subyacente que produce la policitemia, pero la flebotomía con frecuencia aporta mejoría sintomática.

Los signos físicos en relación con policitemia son variables y pueden no alertar al médico sobre el diagnóstico. Si la policitemia es secundaria a una desaturación arterial marcada, la cianosis puede ser muy notable. La historia clínica del paciente aporta indicios importantes sobre la etiología de la policitemia. Cuando se investigan los antecedentes, se debe poner atención especial a la altura en la que vive el paciente y a otros factores ambientales que pueden afectar la saturación de oxígeno, como disfunción pulmonar, tabaquismo, o exposición crónica a monóxido de carbono. Al examinar la piel, las telangiectasias locales son prominentes, debido a que pueden relacionarse con fístulas arterio venosas pulmonares que causan desaturación de oxígeno arterial. El estado cardiopulmonar se evalúa con cuidado y se palpa el abdomen en busca de organomegalias. Acrocianosis, prurito y esplenomegalia tienen implicaciones especiales en el diagnóstico de la policitemia vera.



**EQUIPO:**

Lector de hematócrito

Centrífuga

Microcentrífuga

#### MATERIAL:

- a) Biológico: Sangre obtenida con EDTA
- b) De laboratorio: Tubos de Wintrobe  
Pipetas Pasteur de punta larga con bulbo  
Mechero Bunsen  
Gradilla  
Gradilla de Wintrobe  
Regla de plástico  
Tubos capilares sin heparina  
Barra de plastilina

#### TÉCNICA PARA MACROMÉTODO DE WINTROBE:

1. Mezclar la sangre por inversión, por lo menos durante 5 minutos. No agitarla.
2. Llenar un tubo de Wintrobe hasta la marca 0-10 usando una pipeta Pasteur. Es importante vigilar que no se formen burbujas en la columna de sangre o en el fondo del tubo, al llenarlo. Esto se logra haciendo resbalar la sangre por las paredes del tubo, iniciando en el fondo y sacando la pipeta a medida que se va llenando. Ver figura 5.
3. Centrifugar el tubo a 3,000 r.p.m. durante 30 minutos (para un radio de centrífuga de 22 cm, que da una fuerza centrífuga relativa de 2,200 G). La velocidad de centrifugación se deberá ajustar al radio de la centrífuga, considerando que siempre se deberá tener una fuerza centrífuga relativa mayor a 2,000 G.
4. Leer el límite superior de la columna de eritrocitos, inmediatamente por debajo de la capa gris de leucocitos, en la columna de la derecha (escala ascendente de 1-10cm).
5. El resultado se informa en milímetros por ciento.

#### VENTAJAS:

1. Es un método estandarizado.
2. Sencillo de realizar y de fácil lectura.

#### DESVENTAJAS:

1. El plasma atrapado entre células es alrededor de 3% del volumen.
2. Puede dar resultados inconstantes debido a que, cuando existen alteraciones morfológicas, el plasma que queda atrapado entre las células se incrementa.

#### TÉCNICA PARA EL MICROMÉTODO:

1. Mezclar la sangre por inversión, por lo menos durante 5 minutos. No agitarla.
2. Llenar las dos terceras partes de un tubo capilar por el lado no marcado.
3. Sellar el extremo opuesto (marcado con una banda azul) con la flama del mechero. Esto se hace girando el tubo capilar para lograr el sellado uniforme y el fondo quede redondeado y no en punta. Una alternativa más práctica para el sellado es obturar el extremo distal con plastilina. Ver figura 6.
4. Centrifugar en la microcentrífuga a 12,000 r.p.m. durante 5-8 minutos.
5. Se lee, usando una regla o lector para microhematócrito, las alturas del volumen de eritrocitos y del volumen total de la muestra. Calcular el microhematócrito de la siguiente manera:

$$\text{Hematócrito} = \frac{\text{Altura de eritrocitos (mm)}}{\text{Altura del volumen total (mm)}} \times 100$$

**VENTAJAS:**

1. El plasma atrapado entre las células es mínimo (1%).
2. Resultados muy reproducibles.

**DESVENTAJAS:**

1. Relativamente más difícil de realizar, sobre todo el sellado y dominar la lectura.

**INTERVALOS DE REFERENCIA:**

Al igual que con la hemoglobina y los eritrocitos, se modifican con la edad, el sexo y la altura sobre el nivel del mar. En la Ciudad de Xalapa, Ver., a 1,400 metros sobre el nivel del mar son los que se observan en la siguiente tabla:

EDAD	SEXO	INTERVALOS
Recién nacido	F/M	44-62%
1 mes a 2 años	F/M	33-37%
3 a 10 años	F/M	37-45%
11 a 60 años	Fem.	36-48%
11 a 60 años	Masc.	42-54%
Más de 60 años	F/M	37-45%

En la siguiente tabla, se muestran los valores promedio de hematócrito a diferentes alturas sobre el nivel del mar:

ALTURA EN METROS	MUJERES %		HOMBRES %	
	MEDIA	RANGO	MEDIA	RANGO
Nivel del mar	43.9	37.5-50.2	49.3	45.4-56.2
1000	42.4	37.4-47.4	48.1	43.0-53.2
1860	45.0	39.1-50.9	51.3	45.1-57.5
2220	44.6	39.2-50.0	51.5	46.3-56.7
2670	46.9	40.7-53.1	53.0	46.5-59.5

**NOTA:**

Por su estandarización y por su reproducibilidad, el hematócrito ha sido considerado el mejor parámetro para evaluar la anemia, cuando se hace por métodos manuales.

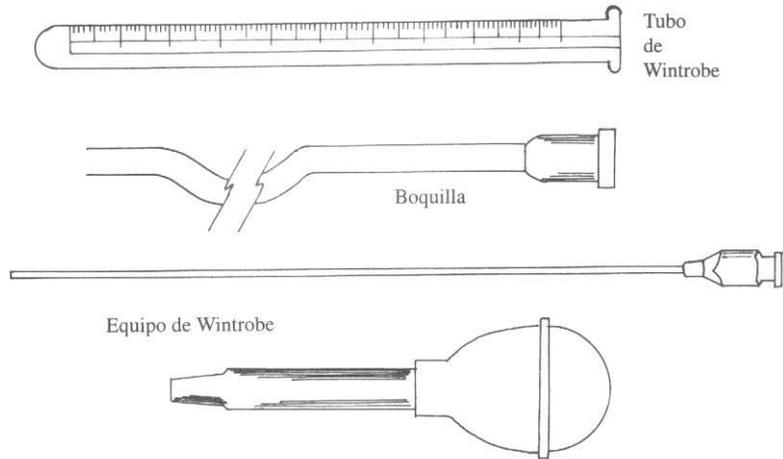


Figura 5

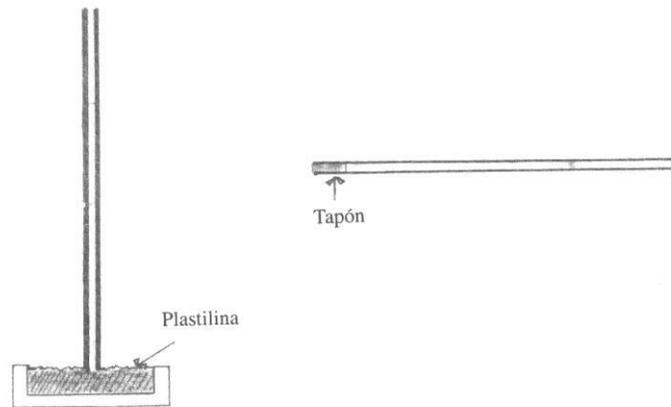


Figura 6

## “RECUENTO DE GLÓBULOS ROJOS”

**DURACION: 02 HR**

### OBJETIVO(S):

Que el alumno aprenda a efectuar correctamente el recuento de glóbulos rojos en muestras de sangre por el método manual (hemacitómetro), el cual es una determinación básica en el laboratorio de hematología, así como también que identifique la importancia y utilidad clínica del recuento de eritrocitos.

### FUNDAMENTO:

El recuento de eritrocitos consiste en diluir la sangre con un diluyente apropiado, el cual debe ser isotónico para evitar la lisis y la estructura dentada de los eritrocitos, además debe prevenir su aglutinación, la dilución deberá hacerse en proporción exacta y posteriormente se examinará al microscopio un volumen conocido de la muestra colocada en el hemacitómetro (Cámara de Neubauer), contando el número de elementos que se encuentran en la retícula de la cámara y mediante una operación matemática se obtiene la cifra total de células.

### GENERALIDADES:

Los eritrocitos constituyen cerca de 45% del volumen sanguíneo. Las cuentas más altas de eritrocitos se presentan al nacer. La población de eritrocitos neonatales es macrocítica y contiene entre 2 y 6% de reticulocitos. Además, pueden observarse de 3 a 10 eritrocitos en la sangre periférica durante la primera semana de vida; durante los dos meses siguientes se produce una disminución gradual de eritrocitos. Esta declinación va seguida por un aumento gradual hasta que se alcanzan los valores normales de adulto, hacia los 14 años de edad. Durante la pubertad se percibe una diferencia en el valor de los eritrocitos entre los sexos, con valores más bajos en las mujeres que en los varones. Esto se explica en parte por la teoría de que la hormona masculina estimula la eritropoyesis. La cuenta de eritrocitos varía muy poco en adultos normales de edad avanzada e incrementa un poco después de la menopausia. En altitudes elevadas se nota un incremento fisiológico compensador en los eritrocitos que es proporcional con la disminución de la saturación de oxígeno arterial de la hemoglobina. En los fumadores intensos también es posible compensar la disminución en la saturación de oxígeno mediante un aumento en el número de eritrocitos.

Los recuentos de eritrocitos se expresan como concentraciones células por unidad de volumen de sangre). La unidad de volumen para los recuentos celulares se expresa originalmente como milímetros cúbicos ( $\text{mm}^3$ ) debido a las dimensiones lineales de la cámara hemacitométrica (recuento celular). El International Committe for Standardization in hematology recomienda que la unidad de volumen sea el litro. Puesto que  $1 \text{ mm}^3 = 1,00003 \mu\text{l}$ . Cualquier método de recuento de células incluye tres fases: dilución de la sangre, toma de muestra de la suspensión diluida en un volumen determinado y recuento de las células en este volumen.

El hemacitómetro es un grueso portaobjetos de cristal en cuyo tercio medio están fijadas tres plataformas paralelas que se extienden a lo largo de su superficie. La plataforma central está subdividida por una ranura transversal en dos mitades, cada una más ancha que las dos plataformas laterales y separadas de ellas y entre sí por fosos. Las plataformas centrales o piezas de fondo están exactamente 0.1 mm más bajas que las plataformas laterales y tienen una regla de Neubauer mejorada que tiene 3 x 3 mm y está subdividida en nueve cuadrados secundarios de 1 x 1 mm cada uno. Los cuatro cuadrados de las esquinas se utilizan en el recuento de leucocitos y están subdivididos en 16 cuadrados terciarios.

El cuadrado central milimetrado está dividido en 25 cuadrados terciarios, cada uno de los cuales mide 0.2 x 0.2 mm. Cada uno de estos se divide de nuevo en 16 cuadrados más pequeños. Esta parte sirve para el recuento de glóbulos rojos. Un grueso cubreobjetos, que forma un plano perfecto acompaña la cámara de recuento. Por lo general, la cubierta de cristal tiene superficies irregulares y no debe utilizarse. Cuando el cubreobjetos está situado sobre la plataforma de la cámara de recuento, hay un espacio exacto de 0.1 mm de espesor entre aquel y la plataforma rayada; por consiguiente, cada milímetro cuadrado del rayado forma la base de un espacio que mide 0.1 mm<sup>3</sup>. Las cámaras de recuento y las cubiertas deben lavarse inmediatamente después de su utilización con agua templada; se frotran con un paño limpio sin hilos y se dejan secar al aire. Las superficies no se deben tocar con gasa o trapo de lino, debido a que los tejidos pueden arañar las áreas rayadas, y un arañazo en la cámara o en el cubreobjetos echa a perder el dispositivo. La cámara y el cubreobjetos son difíciles de quitar y pueden originar errores. Antes de su utilización, las superficies deben estar absolutamente limpias, secas y sin hilos ni marcas de agua. Después de limpiarse no se deben tocar excepto los bordes.

Existen numerosas posibilidades de error en todos los recuentos celulares que utilizan el hemacitómetro. Los errores se pueden deber a la naturaleza de la muestra, a la técnica del que realiza el examen y a la utilización de un instrumental inadecuado. Los errores que son inherentes a la distribución de las células en el volumen de recuento se denominan errores de “campo” y se pueden reducir al máximo con sólo contar más células. El conteo de eritrocitos sirve también como un índice para determinar si hay presencia de **anemia o de policitemia**.

La coagulación parcial de la sangre venosa introduce errores por cambios en la distribución de las células o por disminución de su número. Las influencias de la aplicación prolongada del torniquete, la posición del paciente y la relación de tiempo transcurrido al ejercicio y comida y han sido expuestas anteriormente y afectan todos los recuentos celulares tanto como el hemátocrito. El fallo en la mezcla total de la sangre inmediatamente antes de succionar la muestra con la pipeta introduce un error que depende del grado de sedimentación durante el intervalo transcurrido desde que se mezcló la sangre. Los errores causados por técnica defectuosa pueden ocurrir cuando la sangre y el líquido disolvente se succionan con la pipeta, cuando se llena la cámara y cuando se levanta por la introducción de un exceso de sangre diluida, su movimiento después de llenar la cámara de recuento o bien el rebosamiento de la suspensión en el foso. Las inexactitudes en las graduaciones de las pipetas y de las áreas rotuladas y en la profundidad de las cámaras de recuento son causas frecuentes de error. Se pueden disminuir utilizando pipetas y hemacitómetros certificados por el U.S. Bureau of Standards. Incluso en una muestra perfectamente

mezclada se produce variación en el número de células suspendidas que se distribuyen en un volumen dado. Según la ley de Poisson de la distribución, la variación entre los diferentes cuadrados en la cámara viene dada por la fórmula  $DE = \sqrt{m}$ , donde m es el número medio de células por unidad de área y DE es la desviación estándar de los recuentos en estas áreas.

#### TRASTORNOS VINCULADOS COMUNMENTE CON CAMBIOS EN LAS CONCENTRACIONES DE ERITROCITOS:

- CONCENTRACIÓN AUMENTADA: policitemia, trastornos mieloproliferativos, deshidratación.
- CONCENTRACIÓN DISMINUIDA: anemia, leucemia aguda, síndromes mielodisplásicos, hemorragia, hemólisis.

#### EQUIPO:

Agitador eléctrico para pipetas de Thoma  
Reloj de laboratorio  
Microscopio  
Contador de células

#### MATERIAL:

- a) Biológico: Sangre obtenida con EDTA
- b) De laboratorio: Pipetas de Thoma para glóbulos rojos con boquilla  
Cámara de Neubauer  
Líquido diluyente de Gower  
Tubos de ensayo de 13 x 100 mm  
Pipetas serológicas de 5 ml

#### TÉCNICA:

1. Mezclar la sangre por lo menos durante 5 minutos.
2. Llenar con sangre la pipeta de Thoma hasta la marca 0.5.
3. Diluir con el líquido diluyente de Gower, llenando hasta la marca 101; se debe evitar la formación de burbujas, que alterarían la dilución. Para ello, se recomienda rotar la pipeta al aspirar y mantenerla en posición vertical. El exceso en la punta se elimina con papel secante. Con esto, obtenemos una dilución 1:200
4. Agitar durante un minuto en el agitador eléctrico.
5. Inmediatamente. Eliminar las cuatro primeras gotas y cargar la Cámara de Neubauer en sus cuadrículas. Dejar reposar un minuto a temperatura ambiente que permita la sedimentación de las células.
  
6. Contar al microscopio con objetivo seco fuerte 40x, verificando primero que la distribución de las células es homogénea; en caso contrario, se deberá repetir la prueba. La cuenta se realiza en 80 cuadros pequeños del área central de la cámara, seleccionando para ello un cuadro mediano central y cuatro angulares. Figura 7.

7. Multiplicar el número de eritrocitos contados por 10,000 para obtener el total de glóbulos rojos por  $\text{mm}^3$  de sangre.

La fórmula utilizada para realizar los cálculos es la siguiente:

$$\frac{N \times 200 \times 10 \times 400}{80} = N \times 10,000$$

Donde:

N = Número de eritrocitos contados

200 = Título de dilución

10 = Corrección de la profundidad de la cámara para ajustar el volumen a  $1 \text{ mm}^3$

400 = Total de cuadros pequeños del cuadro central de la cámara

80 = Total de cuadros pequeños contados

#### INTERVALOS DE REFERENCIA:

Al igual que con la hemoglobina, se modifican con la edad, el sexo y la altura sobre el nivel del mar. En la Ciudad de Xalapa, Ver., a 1,400 metros sobre el nivel del mar se muestran en la siguiente tabla:

EDAD	SEXO	INTERVALOS X $10^6/\text{MM}^3$
Recién nacido	F/M	4.5-6.5
1 mes a 2 años	F/M	3.5-4.0
3 a 10 años	F/M	4.1-5.0
11 a 60 años	FEM	4.0-5.2
11 a 60 años	MASC	4.6-5.8
Más de 60 años	F/M	4.1-5.0

En la siguiente tabla se muestran los valores promedio de eritrocitos a diferentes alturas sobre el nivel del mar:

ALTURA EN METROS	MUJERES Eritrocitos x $10^6 / \text{mm}^3$		HOMBRES Eritrocitos x $10^6 / \text{mm}^3$	
	Media	Rango	Media	Rango
Nivel del mar	4.65	3.88-5.42	5.15	4.39-5.91
1000	4.69	4.17-5.21	5.28	4.63-5.93
1860	4.92	4.33-5.51	5.76	4.94-6.58
2220	4.99	4.27-5.71	5.69	5.10-6.28
2670	4.95	4.31-5.59	5.63	4.95-6.31

NOTA:

Debe tomarse en cuenta que aun en las mejores condiciones de trabajo, la cuenta de eritrocitos en la cámara de Neubauer tiene un error del 10 al 15%, por tal motivo su cuenta manual no es de mucha confianza en la evaluación de anemias, por lo que se ha optado por el conteo en equipo automatizado.

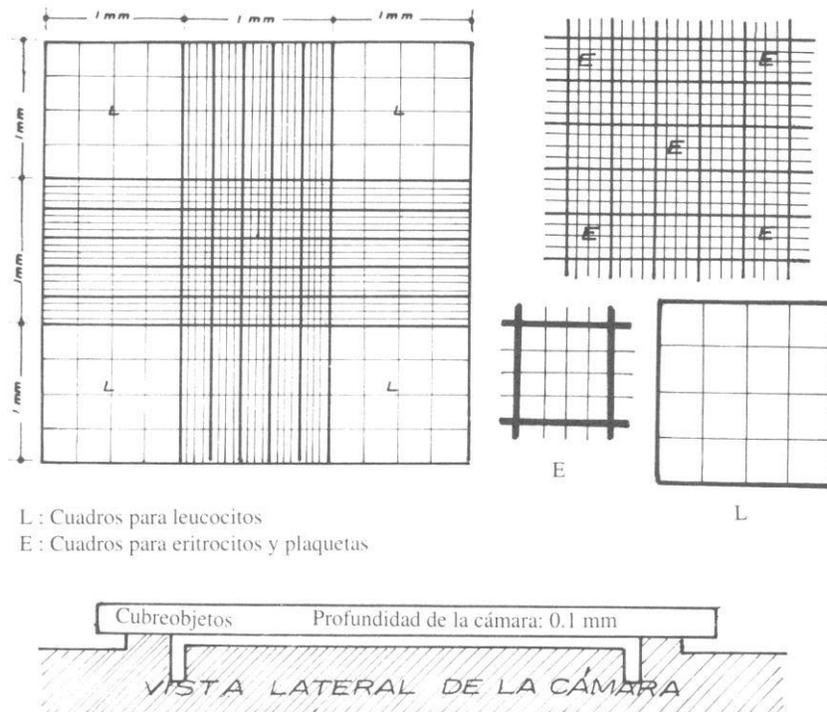


Figura 7

FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA  
LABORATORIO DE HEMATOLOGÍA  
PRÁCTICA NO. 7  
“CUANTIFICACIÓN DE HEMOGLOBINA”  
**DURACION: 01 HR**

**OBJETIVO(S):**

Que el alumno aprenda a cuantificar con precisión y exactitud la hemoglobina en muestras, sanguíneas por medio del método colorimétrico, así como también su importancia y utilidad clínica en las diferentes patologías.

**FUNDAMENTO:**

La sangre se hemoliza por agregado de un agente tensoactivo. Con el ferricianuro de potasio se oxida el hierro ferroso de la hemoglobina para producir metahemoglobina. El cianuro de potasio estabiliza la metahemoglobina como cianometahemoglobina. La coloración producida es directamente proporcional a la concentración de la hemoglobina presente.

**GENERALIDADES:**

La hemoglobina es el principal componente de los glóbulos rojos, es una proteína conjugada que sirve de vehículo para el transporte de O<sub>2</sub> y de CO<sub>2</sub>. La masa de eritrocitos de un adulto contiene unos 600 gr de hemoglobina, capaz de transportar 800 ml de oxígeno.

La hemoglobina ocupa cerca de 33% del volumen del eritrocito y participa en 90% del peso seco total de la célula. Cada célula contiene entre 27 y 32 pg de hemoglobina. En estados anémicos, la célula puede contener menos hemoglobina, por lo cual disminuye la capacidad transportadora de oxígeno de la sangre. La membrana del eritrocito y sus vías metabólicas son responsables de proteger y mantener a la molécula de hemoglobina en su estado funcional. Los trastornos en la membrana que alteran su permeabilidad o las alteraciones en los sistemas enzimáticos celulares, pueden producir cambios en la estructura y función de la molécula de hemoglobina o ambas cosas y afectar la capacidad de esta proteína para suministrar oxígeno.

La estructura de la hemoglobina está integrada por un grupo prostético ferroprotoporfirínico llamado protohem o hem, y una fracción proteica heterogénea llamada globina. La globina está constituida por 2 pares de cadenas polipeptídicas (2  $\alpha$  y 2  $\beta$ ), dispuestas en forma helicoidal espiral. Cada cadena peptídica posee más de 140 aminoácidos situados uno a continuación de otro en forma de una serie de secuencias. Con cada cadena peptídica se engarza a nivel de aminoácido histidina, el átomo de hierro del grupo prostético ferroprotoporfirínico. Dado que la molécula hemoglobínica posee 4 cadenas peptídicas, existen en total 4 ferroprotoporfirinas.

La hemoglobina es una macromolécula integrada por un tetrámero cuyo peso molecular es de 68,000 disociable en 2 subunidades de 34,000 y 4 de 17,000. Los 4 monómeros que integran el tetrámero de la hemoglobina del adulto están unidos por fuerzas intermoleculares. La secuencia de los diversos aminoácidos en las cadenas peptídicas

integran la estructura primaria de la globina. La cadena  $\alpha$  tiene 141 aminoácidos y la  $\beta$  146. En las hemoglobinas patológicas la anormalidad estriba en un cambio y alteración en la secuencia de los aminoácidos, de forma que uno o varios de ellos son suplantados por otros. O también debido a cambios o mutaciones en los locus determinantes de la información para la biosíntesis de la hemoglobina. Un glóbulo rojo posee unos 280 millones de moléculas hemoglobínicas. La hemoglobina es sintetizada en el ámbito de médula ósea. Cada molécula hemoglobínica transporta 4 moléculas de oxígeno.

Se forman diferentes tipos de hemoglobina, de acuerdo con la composición de las cadenas tétradas de globina relacionadas. La composición de estas cadenas de globina es responsable de las distintas propiedades funcionales y físicas de la hemoglobina. En los adultos normales existen cuatro tipos de cadenas de globina:  $\alpha, \beta, \delta$  y  $\gamma$ . Un par de cadenas  $\alpha$  se combina con un par de cadenas  $\beta, \delta$  o  $\gamma$  para formar tres tipos de hemoglobinas: hemoglobina A, hemoglobina  $A_2$  y hemoglobina F, respectivamente.

La eritropoyesis intrauterina en el primer trimestre de gestación está relacionada con la producción de hemoglobinas embrionarias, Gower I, Gower II y portland. Dichas hemoglobinas embrionarias están formadas por la combinación de cadenas de globinas embrionarias  $\epsilon$  y  $\zeta$  en pares, o cadenas embrionarias en combinación con  $\alpha$  y  $\tau$ . Estas hemoglobinas primitivas se descubren durante la hematopoyesis en el saco vitelino y por lo común no son detectables después de ocho semanas de gestación, debido a que la producción de cadenas embrionarias termina en este momento. La hemoglobina F es la hemoglobina fetal predominante formada durante la eritropoyesis del hígado y médula ósea en el feto. HbF constituye 90 a 95 % de la producción total de hemoglobina en el feto hasta las 34 a 36 semanas de gestación. En los adultos la hemoglobina A la cual consiste en dos cadenas  $\alpha$  y dos cadenas  $\beta$ , es la hemoglobina más importante.

Existen diversos métodos para calcular la cantidad de hemoglobina; los más sencillos son de índole colorimétrica y estriban en deducir el color de una muestra de sangre, la cantidad de pigmento hemoglobínico que contiene. La hemoglobinometría es la medida de la concentración de la hemoglobina en la sangre. La anemia una disminución de la concentración en sangre de hemoglobina por debajo de los normal, del recuento eritrocitario o del hematócrito, constituyen una alteración muy corriente y una frecuente compilación de otras enfermedades.

La concentración de hemoglobina se puede realizar por el método de la cianometahemoglobina, por el la oxihemoglobina y el que mide el contenido de hierro. El método de la cianometahemoglobina presenta la ventaja de ser cómodo, y de ser una solución estándar estable, fácilmente disponible; además de que se miden la mayoría de las formas de hemoglobina.

La producción anormal de hemoglobina suele ser provocada por trastornos del hem o de la síntesis de la globina. El resultado de este defecto de la maduración citoplásmica es la *anemia hipocrómica microcítica*. La síntesis defectuosas del hem en ocasiones es producida por un metabolismo defectuoso tanto del hierro como de la porfirina. Estas delecciones y defectos son resultado de un trastorno hereditario conocido como **talasemia**. Las anemias

que se forman por defectos en la síntesis del hem producidos por un metabolismo defectuoso del hierro son: **anemia sideropénica y anemia sideroacréstica**. La anemia sideropénica se caracteriza por una falta de hierro para la síntesis del hem debido a una ingestión reducida de hierro, absorción anormal o un incremento en la pérdida de hierro. También se conoce como anemia por deficiencia de hierro. Las anemias sideroacrésticas se caracterizan por tener depósitos adecuados o excesivos de éste, pero en ellas existe bloqueo para la inserción del mismo en el anillo protoporfirina para formar el hem. Este bloqueo quizá se deba a un defecto adquirido o hereditario de la síntesis de la porfirina (anemia sideroblásticas) o por inadecuada reutilización del hierro a partir del macrófago (anemia de los padecimientos crónicos).

Las fases tempranas de la deficiencia de hierro habitualmente no dan manifestaciones clínicas, pero una vez que la disminución de los depósitos de hierro es completa se desarrolla la anemia y aparecen síntomas clínicos. Los síntomas como debilidad y letargo se considera que se deben a hipoxia provocada por la disminución de la hemoglobina. Dichas anormalidades comprenden coiloniquia, glositis, anillo cricofaríngeo, disfunción muscular, deterioro en la regulación de la temperatura y gastritis.

La **anemia sideroblásticas** se presenta con diversas manifestaciones clínicas y bioquímicas que reflejan la existencia de múltiples mecanismos patogénicos subyacentes. Sin embargo, todos los tipos se caracterizan por: 1) un aumento del hierro corporal total, 2) presencia de sideroblastos anillados en médula ósea y 3) anemia hipocrómica. En pacientes con anemias sideroblásticas adquiridas, secundarias a drogas o neoplasias, predominan manifestaciones de la enfermedad subyacente hereditaria o con ARSA, frecuentemente inician con signos y síntomas de anemia. En las anemias sideroblásticas hereditarias por lo general aparecen los signos que se acompañan de sobrecarga de hierro, incluyendo datos como hepatomegalia, esplenomegalia y diabetes. En fases más tardías de la enfermedad puede afectarse el funcionamiento del corazón. La anemia de los padecimientos crónicos se define por lo regular como aquella que aparece en pacientes con infecciones crónicas, trastornos inflamatorios, o problemas neoplásicos y que no se deben a hemorragia o hemólisis o a falla de la médula ósea y que se caracterizan por hipoferremia con depósitos de hierro normales. Las talasemias se deben a mutaciones genéticas que disminuyen la velocidad de síntesis de uno de los elementos constitutivos de las cadenas de globina, por lo general  $\alpha$  o

$\beta$ , de la hemoglobina. La disminución en la síntesis de las cadenas de globina puede deberse a pérdidas del gen estructural o a mutaciones en los sitios de control entre genes, los cuales perturban o evitan la expresión de los genes. La primera manifestación de la presencia de talasemia es en general alguna combinación de anemia, microcitosis, hipocromia y células blanco en la BH rutina. Los pacientes con talasemia en la categoría intermedia muestran una anemia moderada con microcitosis marcada. La prevención de las formas más graves de talasemia es posible ahora gracias a la detección en poblaciones de alto riesgo y por el diagnóstico prenatal.

EQUIPO:

Espectrofotómetro

Reloj de laboratorio

**MATERIAL:**

- a) Biológico: Sangre obtenida con EDTA
- b) De laboratorio: Pipetas de Salí con boquilla
  - Pipetas volumétricas de 5 ml
  - Tubos de ensayo de 13 x 100 mm
  - Celdas para espectrofotómetro
  - Gradilla
  - Papel milimétrico
  - Diluyente de Drabkin (sol. Cianometa)
  - Solución patrón de hemoglobina de 60mg/dl
  - Pipetas serológicas de 1 ml
  - Pipetas serológicas de 5 ml

**TÉCNICA:**

Debido a que la cuantificación se realizará comparando lecturas fotométricas con las obtenidas de una solución patrón, primeros debemos realizar una curva de calibración.

**NOTA:** Esta práctica se podrá llevar a cabo utilizando el kit que exista en el laboratorio de hematología en el momento actual para la cuantificación de hemoglobina

**CURVA DE CALIBRACIÓN:**

1. Preparar una serie de tubos de la siguiente manera:

TUBO	ESTÁNDAR DE HEMOGLOBINA	SOLUCIÓN DE DRABKIN	CONCENTRACIÓN DE HB(gr/dl)
1	5.0 ml	0.0 ml	15.0
2	4.0 ml	1.0 ml	12.0
3	3.0 ml	2.0 ml	9.0
4	2.0 ml	3.0 ml	6.0
5	1.0 ml	4.0 ml	3.0
6	0.0 ml	5.0 ml	0.0

2. Mezclar cada tubo por inversión y dejar reposar durante 10 minutos.
3. Leer transmitancia a una longitud de onda de 540 nm ajustando a 100% con el tubo n0. 6 (blanco de cianometa).
4. Hacer la curva en papel milimétrico graficando concentración contra transmitancia. Una curva de calibración correcta debe ser una línea uniendo todos los puntos.
5. Cálculos: se utiliza la fórmula siguiente:

$$\frac{S \times D}{1000} = \text{g de hemoglobina/ dl}$$

Donde:

S = Concentración del estándar (60mg/dl)

D = Factor de dilución de la muestra (251)

La concentración del estándar puede variar de lote a lote, por lo que es indispensable verificarla y, en su caso, sustituirla en la fórmula.

En cuanto al factor de dilución, se obtiene de la siguiente manera:

Sol. De cianometa .....5.0 ml  
 Muestra de sangre .....0.02 ml  
 Volumen total..... 5.02 ml

Al dividir 5.02/ 0.02 = 251

La división entre 1000 transforma los miligramos del estándar en gramos. Sustituyendo en la fórmula tenemos:

Tubo no.1  $\frac{60 \times 251}{1000} = 15.0$  g de Hb/dl  
 Tubo no. 2  $\frac{(60/1.25) \times 251}{1000} = 12.0$  g de Hb/dl  
 Tubo no. 3  $\frac{(60/1.66) \times 251}{1000} = 9.0$  g de Hb/dl  
 Tubo no. 4  $\frac{(60/2.50) \times 251}{1000} = 6.0$  g de Hb/dl  
 Tubo no. 5  $\frac{(60/5.00) \times 251}{1000} = 3.0$  g de Hb/dl  
 Tubo no. 6  $\frac{(60/0.00) \times 251}{1000} = 0.0$  g de Hb/dl

#### CUANTIFICACIÓN DE HEMOGLOBINA:

Una vez obtenida la curva de calibración., podemos proceder a medir la hemoglobina en muestras de sangre, de la siguiente manera:

1. Usando pipeta volumétrica., pipetear 5.0 ml de la solución de Drabkin en un tubo de ensayo de 13 x 100mm.
2. Agregar 0.02 ml de sangre con la pipeta de Sahli.
3. Mezclar por inversión y dejar reposar durante 10 minutos.
4. Leer transmitancia a 540 nm ajustando a 100% con blanco de cianometa.
5. Convertir el porcentaje de transmitancia en gramos de hemoglobina por decilitro, usando la curva de calibración.
6. Un método alternativo para la cuantificación, sin usar la curva de calibración, puede ser el uso de una solución patrón para obtener el factor de calibración.

Un factor de calibración se obtiene de la siguiente manera:

$$\text{Factor} = \frac{\text{Concentración del estándar}}{\text{Absorbancia}}$$

Una vez obtenido éste, la concentración de hemoglobina, en una muestra, se obtiene de la siguiente manera:

$$\text{Concentración de Hemoglobina} = \text{Absorbancia} \times \text{Factor}$$

**INTERVALOS DE REFERENCIA:**

Se modifican con la edad, el sexo y la altura sobre el nivel del mar. En la siguiente tabla, se muestran los valores para la Ciudad de Xalapa, Ver., que tiene una altura media de 1400 metros sobre el nivel del mar:

<b>EDAD</b>	<b>SEXO</b>	<b>INTERVALOS</b>
Recién nacido	F/M	12.8-18.0 g/dl
1 mes a 2 años	F/M	11.0-13.0 g/dl
3 a 10 años	F/M	12.0-14.5 g/dl
11 a 60 años	FEM.	12.0-16.0 g/dl
11 a 60 años	MASC.	14.0-18.0 g/dl
Más de 60 años	F/M	12.5-14.5 g/dl

En la siguiente tabla se muestran los valores promedio de hemoglobina a diferentes alturas sobre el nivel del mar:

<b>ALTURA EN METROS</b>	<b>MUJERES g/dl</b>		<b>HOMBRES g/dl</b>	
	<b>Media</b>	<b>Rango</b>	<b>Media</b>	<b>Rango</b>
Nivel del mar	14.1	11.86-16.34	16.0	13.64-18.36
1000	13.8	11.90-15.70	15.8	13.96-17.64
1860	14.5	12.74-16.26	16.8	14.64-18.96
2220	14.6	12.64-16.56	17.4	15.56-19.24
2670	15.3	13.10-17.50	17.6	15.24-19.96

**NOTA:**

Es importante recordar que los intervalos mencionados sólo son de “referencia” y que en condiciones ideales, cada laboratorio debe establecer sus propios valores, con la finalidad de que la evaluación de los datos sea acorde con la realidad, pues un valor que para la Ciudad de Veracruz sea normal, será bajo para la Ciudad de México.

FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA  
LABORATORIO DE HEMATOLOGÍA  
PRÁCTICA N.º. 8  
“RECUESTO DE RETICULOCITOS”  
**DURACION: 02 HR**

**OBJETIVO(S):**

Que el alumno aprenda a identificar a los reticulocitos, realizando su recuento porcentual en muestras de sangre, así como también su interpretación y utilidad clínica.

**FUNDAMENTO:**

El RNA residual de los hematíes inmaduros (reticulocitos) es precipitado y teñido con una tinción supravital de azul de cresil brillante, lo cual permite identificarlos. Se preparan las extensiones y se cuentan las células que contienen precipitados (reticulares) teñidos. Los resultados se expresan en porcentajes de los reticulocitos examinados y en cifras absolutas por milímetro cúbico.

**GENERALIDADES:**

Los reticulocitos son eritrocitos jóvenes anucleados, pero que contienen RNA residual y mitocondrias en el citoplasma. El RNA residual le da un tinte azulado con la tinción de WRIGHT. La célula puede describirse en forma más apropiada como un eritrocito policromatófilo. Los reticulocitos son algo más grandes que el eritrocito maduro y constituyen alrededor del 1% de los glóbulos rojos circulantes. Estas células pueden ser identificadas por su reacción con los colorantes supravitales, azul de metileno o azul de cresilo brillante. Con este método los reticulocitos son identificados por la presencia de inclusiones azul púrpura.

Los reticulocitos suelen permanecer de 2 a 3 días en la médula ósea y un día adicional en la sangre periférica antes de convertirse en eritrocitos maduros. La cuenta de reticulocitos en la sangre periférica indica el grado de eficacia de la actividad en la médula ósea y es una de las pruebas de laboratorio más eficaces en relación con el costo dentro de la clasificación de la fisiopatología de la anemia. En la persona sana de edad avanzada parece disminuir el periodo de vida del eritrocito. Esto se compensa por una médula ósea activa, de tal modo que la hemoglobina y el hematócrito permanecen dentro de los límites de referencia de otros adultos. No obstante, hay una ligera reticulocitosis que refleja el aumento en la producción de eritrocitos. El número de reticulocitos se expresa como porcentaje del número total de eritrocitos contados. Pueden producirse interpretaciones erróneas cuando solo se informa el porcentaje de reticulocitos presentes en la sangre periférica, ya que estos resultados dependen del número total de eritrocitos presentes en la sangre periférica. Si la cifra total de eritrocitos está disminuida, el porcentaje de reticulocitos no refleja de manera precisa la producción de nuevos eritrocitos por la médula ósea. Puede usarse la cifra de reticulocitos para evitar errores de interpretación debidos a la cifra total de eritrocitos y el aumento de la estimulación de la médula ósea.

En la anemia se necesita un índice de actividad eritropoyética más preciso que la cuenta relativa de reticulocitos. Cuando se comunica como porcentaje, no indica la relación entre la masa de eritrocitos de la sangre periférica y el número de reticulocitos que se encuentran

en producción de eritrocitos por la médula ósea en respuesta a la anemia, una cuenta de reticulocitos de 0.5 a 1.5% dentro de los límites de referencia nunca es normal para un individuo anémico. Una cuenta de reticulocitos corregida supera este aspecto de dilución y es útil para evaluar la respuesta de la médula ósea en la **anemia**. La corrección hace ajustes proporcionales a la intensidad de la anemia. La corrección hace ajustes proporcionales a la intensidad de la anemia. La corrección se conoce como índice de producción de reticulocitos.

La anemia suele clasificarse según sus causas o por sus características morfológicas. Ambas clasificaciones son importantes, pues ninguna de ellas resulta completamente satisfactoria. La anemia puede ser causada por pérdida crónica de sangre; la pérdida de sangre puede depender de varias causas, como hemorragia vaginal excesiva o pérdida de sangre hemorroidal. Cada uno de estos tipos de hemorragia puede depender de una o más causas, como hemorragia funcional o tumor maligno del útero, en un caso, y hemorroides simples o hemorroides acompañando a cirrosis del hígado en otro.

Cuando la anemia depende de disminución en la producción de sangre, el estudio de la sangre periférica suele demostrar anemia normocítica o macrocítica acompañada de un número normal o bajo de reticulocitos. La producción de sangre puede ser inadecuada por dos motivos: deficiencia de factores esenciales para la eritropoyesis, o incapacidad de la médula ósea para utilizar las sustancias esenciales, aunque están disponibles. La pérdida aguda de sangre suele ocasionar anemia de tipo normocítico y normocrómico. Aunque el volumen total de sangre cae inmediatamente después de la hemorragia, el hematócrito puede no reflejar el grado de pérdida sanguínea hasta que han transcurrido 48 horas. En personas con médula ósea que responde bien, la hemorragia aguda, que brinda un estímulo bien conocido para la eritropoyesis, suele ir seguida de aumento de plaquetas, leucocitos y reticulocitos. La pérdida crónica de sangre es causa frecuente de anemia. La hemorragia de este tipo casi siempre origina deficiencia de hierro que, si es intensa, se caracteriza por anemia microcítica hipocromica acompañada de eritropoyesis normoblástica en la médula ósea. En grados ligeros de anemia causados por falta de hierro, puede no haber hipocromía ni microcitosis.

La eritropoyetina inicia la proliferación y la maduración de los eritroblastos inmaduros; la hiperplasia eritroide comienza a muy breve plazo en la médula ósea y puede identificarse fácilmente en muestras de ella obtenidas a los cinco días. La EPO puede ocasionar la liberación prematura de reticulocitos en la circulación. Seis a 12 horas después de la hemorragia se detecta un aumento en el número de reticulocitos y se producen otros más en los siguientes días. Con base en el número absoluto de reticulocitos, es posible estimar la producción diaria de eritrocitos, después de la corrección que incorpore la liberación prematura de reticulocitos al dividir el número absoluto de ellos entre dos. La administración de eritropoyetina se ha utilizado para acelerar la recuperación de la anemia postoperatoria y facilitar las dominaciones de sangre autóloga para transfusión. En la **bartonelosis** que es una enfermedad transmitida por la mosca de la arena, ocasiona una **anemia hemolítica**, y en la sangre se puede observar un gran número de eritrocitos nucleados y también reticulocitos.

#### Utilidad clínica

El recuento de reticulocitos se utiliza para medir la actividad eritropoyética de la médula ósea en anemias y en otras condiciones hematológicas.

#### Variables por enfermedad:

**Aumentado:** Anemias hemolíticas, anemias posthemorrágicas y anemias carenciales en tratamiento, hepatitis viral, tripanosomiasis, histoplasmosis, enfermedad de Hodgkin, leucemia, policitemia vera, déficit de vitamina C, abetalipoproteinemia, talasemia mayor y menor, enfermedad de HbC, enfermedad de HbH, mielofibrosis, eritroblastosis fetal.

**Disminuido:** Aplasias medulares, anemias carenciales y diseritropoyéticas, hipo- tiroidismo, septicemia, hipofunción testicular, linfoma no Hodgkin.

#### Variables por drogas:

**Aumentado:** Alopurinol, aminopirina, antipiréticos, antipirina, arseniales, aspirina, corticotropina, plomo, levodopa, metildopa, naproxeno, nitrofuranos, penicilina, procainamida, quinidina, sulfonas.

**Disminuido:** Cloramfenicol, clorpropamida, citaralina, datinomicina, metotrexato, rinblastina.

#### Variables preanalíticas:

**Aumentado:** Donación de sangre. Plomo. Alcohol. Ejercicio.

#### EQUIPO:

Baño maría a 37<sup>0</sup> C

Microscopio

Agitador de pipetas

#### MATERIAL:

- a) Biológico: Sangre obtenida con EDTA.
- b) De laboratorio: Tubos de ensayo de 10 x 75 mm  
Pipetas Pasteur con bulbo de hule  
Portaobjetos  
Puentes de vidrio para tinción  
Solución colorante de nuevo azul de metileno  
Solución de azul de cresil brillante  
Gradilla  
Aceite de inmersión  
Cámara de Neubauer  
Pipeta de Thoma para glóbulos rojos con boquilla

#### TÉCNICA:

Con ambos colorantes se sigue la misma técnica.

1. Usando la pipeta Pasteur, colocar dos gotas de sangre perfectamente mezclada en un tubo de ensayo de 10 x 75 mm.
2. Agregar dos gotas del colorante (azul de cresil brillante o nuevo azul de metileno).
3. Mezclar suavemente e incubar a 37<sup>0</sup> C durante 15 ó 20 minutos.
4. Resuspender los eritrocitos mediante mezclado suave y hacer extensiones delgadas.

5. Cuando el frotis esté seco, leer al microscopio. Contar 500 eritrocitos, anotando el número de reticulocitos encontrados durante esa cuenta.
6. Obtener el porcentaje de reticulocitos mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de reticulocitos} = \frac{\text{No. De reticulocitos} \times 100}{500 \text{ eritrocitos}}$$

7. Para obtener la cantidad de reticulocitos por  $\text{mm}^3$  de sangre, se requiere realizar una cuenta de eritrocitos, cómo se describió en la práctica no. 6, posteriormente se calculan usando la siguiente fórmula:

$$\text{Reticulocitos}/\text{mm}^3 = \frac{\% \text{ de Reticulocitos} \times \text{Eritrocitos}/\text{mm}^3}{100}$$

#### INTERVALOS DE REFERENCIA:

Porcentual = 0.5 a 2%

Absolutos = 20,000 a 120,000/ $\text{mm}^3$

#### NOTA:

El recuento de reticulocitos es un excelente método indirecto para evaluar la eritropoyesis, ya que cuando hay respuesta eritropoyética, se incrementan; sin embargo, cuando la médula ósea no responde, los reticulocitos se encontrarán normales o disminuidos. Es de mayor utilidad, aun, como un índice de la magnitud de la eritropoyesis, al realizar una “Corrección de la cuenta de reticulocitos”, es decir, obtener una “Cuenta corregida de reticulocitos” (CCR) de la siguiente manera:

$$\text{CCR} = \frac{\text{reticulocitos } \% \times \text{hematócrito del paciente}}{\text{Hematócrito normal (45)}}$$

Es recomendable usar el índice de reticulocitos para conocer la eficiencia de la eritropoyesis; éste se obtiene dividiendo el CCR entre dos (vida media del eritrocito). El valor normal de este índice es de 1 a 2, que nos indica que conforme hay destrucción de una célula, se produce otra, es decir, que la eritropoyesis es eficaz. Un valor mayor indica que la médula ósea tiene un aumento en su producción (hemorragia, hemólisis, respuesta a tratamiento), en tanto que un valor disminuido sugiere una producción mínima, o sea, eritropoyesis ineficaz (anemia aplásica, aplasia pura de serie roja, anemias megaloblásticas).

FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA  
LABORATORIO DE HEMATOLOGÍA  
PRÁCTICA N0. 09  
“DETERMINACIÓN DE HIERRO SÉRICO”  
**DURACION: 01 HR**

**OBJETIVO:**

Que el alumno aprenda el método colorimétrico para la determinación de hierro sérico, así como su interpretación y correlaciones clínico-patológicas.

**FUNDAMENTO:**

En el suero, el hierro está unido a la proteína transferrina. En un amortiguador de fosfato débilmente ácido es escindido el hierro, quedando las proteínas séricas en solución. Tras la reducción con ascorbato de sodio se transforma el hierro con un reactivo específico (batofenantrolinasulfonada) en un compuesto de color rojo y se determina fotométricamente.

**GENERALIDADES:**

Una vez que el hierro se encuentra en las células mucosas, puede combinarse con la apoferritina para formar ferritina, o bien, logra cruzar hacia el plasma y combinarse en forma férrica con la proteína transportadora, la transferrina. Esta es una proteína plasmática genuina mediadora del intercambio de hierro en los tejidos. No se pierde al transportar el hierro a las células, sino que regresa al plasma y vuelve a usarse. La transferrina, una globulina  $\beta_1$  es una cadena polipeptídica, la cual tiene una vida media de cerca de 8 días. Se sintetiza en el hígado. Está compuesta de 2 partes homólogas, cada una de las cuales se divide a su vez en 2 distintos dominios. Cada parte contiene un sitio único del hierro, situado en una hendidura entre los dominios. La unión del hierro férrico a uno u otro dominio es fortuito. Si sólo un lóbulo de transferrina se une a una molécula de hierro, se le llama transferrina monoférrica, mientras que si ambos sitios quedan ocupados se conoce como transferrina diférrica. La concentración del hierro sérico es más o menos de 70 a 201 mg/dl y casi todo este hierro (95%) se combina con la transferrina; por tanto, la transferrina se encuentra saturada en una tercera parte con hierro.

Las pruebas de laboratorio para determinar el estado del hierro comprenden la cuantificación del hierro sérico y con frecuencia el cálculo del porcentaje de saturación de la transferrina. Esta se logra medir directamente y se puede calcular la saturación de transferrina como hierro sérico/transferrina  $\times 2/100^3$ . La transferrina también suele medirse desde el punto de vista funcional como la máxima cantidad de hierro capaz de unirse a una muestra de suero. A medida que aumentan los depósitos de hierro se incrementa también el hierro sérico, disminuye la CTFH y aumenta la saturación de transferrina; por el contrario, si los depósitos de hierro disminuyen o no existen, el hierro sérico baja, la CTFH aumenta y la saturación de transferrina disminuye. Una saturación de transferrina por debajo de 15% es un indicador de deficiencia de hierro, mientras que una saturación por arriba de 55% permite diagnosticar sobrecarga de hierro o hemocromatosis. En los pacientes con deficiencias congénitas de la transferrina, el hierro se acumula en el hígado y el bazo, y en cambio,

existe poco hierro en los normoblastos en desarrollo. Estos datos destacan la importancia de la transferrina en el transporte del hierro.

La deficiencia de hierro suele presentarse por hemorragia, demanda excesiva de hierro, absorción deficiente o por dieta inadecuada. Cuando existe hemorragia o un aumento en la demanda, la disminución de hierro se produce más rápidamente. La anemia por deficiencia de hierro frecuentemente se acompaña de gastritis atrófica de aclorhidria. Los síntomas que se han descrito en niños con deficiencia de hierro son: irritabilidad, pérdida de la memoria y dificultad en el aprendizaje. Las deficiencias del sistema inmune se han atribuido a trastornos del mecanismo de defensa del huésped debido a alteraciones del hierro; entre éstos se encuentra la respuesta mitótica disminuida de los linfocitos a la estimulación antigénica. Con la ausencia de hierro en el intestino, otros metales se absorben en cantidades mayores. En casos de deficiencia de hierro avanzada la sangre es típicamente con anemia microcítica, hipocrómica. Puede aparecer trombocitopenia en los pacientes con anemia grave o de larga duración, sobre todo si se acompaña deficiencia de folatos; la deficiencia de hierro con frecuencia se acompaña de trombocitosis. Debido a que la eritropoyesis con deficiencia de hierro es el tipo más frecuente de anemia, su evaluación con frecuencia es un componente indispensable en el trabajo con el paciente anémico.

El riesgo de desarrollar deficiencia de hierro es influido por edad, sexo y estado de salud. El contenido corporal de hierro al nacimiento es de alrededor de 300 mg, aumenta después de alcanzar los requerimientos del crecimiento para al final estabilizarse es de 2 a 4 gr en la edad adulta.

#### Causas de anemia por deficiencia de hierro:

- Insuficiente hierro en la dieta
- Hemorragia crónica en el tracto gastrointestinal o genitourinario
- Úlcera péptica, hernia hiatal, neoplasia, gastritis, consumo excesivo de salicilatos, infestación por parásitos y hemorroides.
- Hemólisis intravascular
- Hemoglobinuria
- Lactancia, mujer menstruando o embarazada
- Mal absorción: posgastrectomía
- Pérdida de hemosiderina: siderosis pulmonar, hemosiderina
- Donaciones repetidas o pérdidas quirúrgicas.

Durante toda la vida, especialmente durante sus años fértiles, la mujer padece un equilibrio precario de hierro y por lo general sus reservas están disminuidas en comparación con el varón, haciéndola más vulnerable a la anemia en caso de cualquier carencia de hierro en la alimentación o por pérdidas excesivas. La leche es mala fuente de hierro y puede producir deficiencia en los lactantes alimentados por tiempo prolongado sólo con leche. Los recién nacidos a término tienen una reserva de hierro que emplean durante tres meses si no se dan suplementos. Los gemelos y los prematuros tienen sus reservas de hierro disminuidas. En los adultos, una dieta pobre única es causa poco común de deficiencia de hierro, pero a menudo contribuye a la anemia, debida primordialmente a algún otro factor. La alimentación de los ancianos que viven solos y que hacen dietas raras, y la de algunos regímenes terapéuticos pueden carecer de hierro. En algunas enfermedades raras el hierro puede acumularse en ciertos órganos y no estar disponible para la síntesis de la hemoglobina. En la hemosiderosis pulmonar el hierro se acumula en el pulmón causando anemia por deficiencia de hierro, y

puede ocurrir una situación semejante en el síndrome de Goodpasture.

En los casos precoces o leves por deficiencia de hierro los eritrocitos pueden ser relativamente normales en tamaño (normocitosis) y número, pero ser hipocrómicos. La concentración media de hemoglobina y la hemoglobina corpuscular media de cada eritrocito están disminuidos, la CMHC es menor de 320 g/lit y la HCM es inferior a 27 pg. En enfermos con el padecimiento más avanzado y grave, los eritrocitos también son de menor tamaño (microcitos) y tienen un VCM reducido. Los frotis teñidos muestran poiquilocitosis, anisocitosis, microcitosis e hipocromasia. La concentración de hemoglobina es menor que lo normal, pero rara vez millones y el hematocrito es de 0.25 a

0.40. Los eritrocitos pueden mostrar resistencia disminuida a la lisis por solución salina o está algo aumentada; puede haber una cantidad elevada de reticulocitos si ha ocurrido hemorragia. La médula ósea muestra hiperplasia eritroide si la causa de la deficiencia de hierro es la hemorragia; los normoblastos son de menor tamaño que lo normal, con citoplasma mal teñido y de forma irregular. Las reservas de hierro de la médula ósea están ausentes.

La anemia por deficiencia de hierro se diagnostica con frecuencia sobre bases clínicas; por administración de una preparación de hierro por la respuesta terapéutica aceptada que confirma el diagnóstico. Sin embargo, resulta preferible la confirmación del diagnóstico clínico por el laboratorio y debe determinarse la concentración de hemoglobina y hacer examen del frotis de sangre. Si hay dudas en relación con el diagnóstico, o si la respuesta al tratamiento es inadecuada, debe determinarse el hematocrito y la CMHC; valores inferiores a 300 gr/lit sugieren deficiencia de hierro. Pueden requerirse, pruebas ulteriores y éstas incluyen niveles séricos del hierro, capacidad de captación y examen de la médula ósea para estudio citológico y distribución de reservas de hierro por tinción. Estas pruebas ayudarán a diferenciar una deficiencia simple de hierro de las talasemias y de las anemias sideroblasticas, en las cuales la hipocromasia se combina con una cifra normal o elevada de hierro sérico y reservas adecuadas de hierro en la médula ósea. Puede ser útil una prueba de absorción del hierro si se sospecha absorción defectuosa.

Debe corregirse la causa subyacente de la anemia tan pronto como sea posible, administrando una preparación de hierro. El hierro por vía bucal es la mejor, pero puede administrarse por vía parenteral si hay indicaciones especiales.

#### EQUIPO:

Centrífuga

Espectrofotómetro

Baño de agua a 37°C.

**MATERIAL:**

- a) Biológico: Sangre obtenida con tubo de tapa roja sin anticoagulante.
- b) De laboratorio: 5 Tubos de ensayo de 13 x 100 mm con tapón de hule
  - 1 Pipeta Pasteur con bulbo de hule
  - 2 Pipetas graduadas de 2 ml
  - 2 Pipetas graduadas de 1 ml
  - Amortiguador (fosfato de sodio 400mmol/l a pH 5.5)
  - Reactivo de coloración (ácido batofenantrolindisulfónico, sal disódica 0.68 mmol/l, fosfato de sodio 400 mmol/l a pH 5.5)
  - Ascorbato de sodio
  - Solución patrón de hierro (1.0microgramos/ml = 17.91 micromol/l)

**TÉCNICA:**

1. Obtener 6 ml de sangre que se dejará coagular para obtener suero.
2. Todo el material deberá estar perfectamente limpio, enjuagado con agua destilada y seco.
3. Montar la prueba de acuerdo al siguiente esquema:

Pipetear en tubos de ensaye:

	<b>PROBLEMA</b>	<b>BLANCO DE SUERO</b>	<b>BLANCO DE REACTIVOS</b>
Ascorbato de sodio	Aprox. 5 mgs.	Aprox. 5 mgs.	Aprox. 5 mgs
Amortiguador	-----	1.0 ml	-----
Reactivo de coloración	1.0 ml	-----	1.0 ml
Agua destilada	-----	-----	1.0 ml
Disolver el ascorbato de sodio agitando despacio			
Suero	1.0 ml	1.0 ml	

Mezclar, tapar los tubos de ensayo y dejarlos 10 minutos en baño maría a 37<sup>0</sup>C o guardarlos durante 30 minutos a temperatura entre 15 y 25<sup>0</sup>C. Después de enfriar a temperatura entre 15 y 25<sup>0</sup>C. Medir las extinciones de los problemas contra el blanco de reactivos y la extinción del blanco de suero contra agua destilada, a 535 nm ó 546 nm

- La punta colmada de la microespátula adjunta equivale a aproximadamente 5 mg. De ascorbato de sodio. La determinación no queda alterada por un exceso de ascorbato de sodio.

### CÁLCULOS:

Para calcular la concentración de hierro a partir de las extinciones medidas a 535nm ó 546 nm se aplican las siguientes ecuaciones:

Concentración de hierro = ( Epr(535) – EB (535)) x 526 microgramos/100 ml

Concentración de hierro = ( Epr(546) – EB(546)) X 568 microgramos/100 ml

Epr = Extinción del problema

EB = extinción del blanco de suero

### INTERVALOS DE REFERENCIA:

HOMBRES = 59 – 158 microgramos/100 ml de suero

MUJERES = 37 – 145 microgramos / 100 ml de suero

**NOTA: Esta práctica se podrá llevar a cabo utilizando el kit que exista en el laboratorio de hematología en el momento actual para la determinar la concentración de hierro.**

FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA  
LABORATORIO DE HEMATOLOGÍA  
PRÁCTICA N0. 10  
“DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE FIJACIÓN DE HIERRO”  
**DURACION: 01 HR**

**OBJETIVO(S):**

Que el alumno aprenda el método colorimétrico para la determinación de la capacidad de fijación del hierro, así como su interpretación y correlaciones clínico-patológicas.

**FUNDAMENTO:**

En el suero, el hierro está unido a la proteína transferrina. Normalmente esta proteína se combina con el hierro en aproximadamente 1/3 de su capacidad de fijación (hierro sérico). La cantidad de hierro con que la transferrina puede combinarse adicionalmente se denomina capacidad libre de fijación de hierro. La cantidad total de hierro contenida en el suero tras saturación de éste es la capacidad total de fijación de hierro. Para determinar la capacidad libre de fijación de hierro se añade al suero una cantidad excesiva de hierro. Bajo condiciones favorables (pH 8.3) se produce al cabo de breve tiempo una saturación de la transferrina con hierro. El hierro no ligado se transforma tras reducción con un reactivo específico del hierro (batofenantrolina sulfonada) en un compuesto de color rojo y es determinado fotométricamente. La diferencia entre el suero añadido y el hierro no ligado indica la capacidad libre de fijación de hierro.

De la suma de la capacidad de fijación de hierro y la concentración de hierro en el suero, resulta la capacidad total de fijación de hierro.

**GENERALIDADES:**

La producción anormal de hemoglobina suele ser provocada por trastornos del hem o de la síntesis de la globina. El resultado de este defecto de la maduración citoplásmica es la anemia hipocrómica microcítica. La síntesis defectuosa del hem en ocasiones es producida por un metabolismo defectuoso tanto del hierro como de la porfirina. Las anemias por defectos de la síntesis del hem producidos por un metabolismo defectuoso del hierro son: anemia sideropénica y anemia sideriacrética. La anemia sideropénica se caracteriza por una falta de hierro para la síntesis del hem debido a una ingestión reducida de hierro, absorción anormal o un incremento en la pérdida de hierro. Las anemias sideroacréticas se caracterizan por tener depósitos adecuados o excesivos de éste, pero en ellas existe bloqueo para formar el hem. Este bloqueo quizá se deba a un defecto adquirido o hereditario de la síntesis de la porfirina o por inadecuada reutilización del hierro a partir del macrófago.

El hierro es un componente esencial de la hemoglobina, de la mioglobina y de ciertas enzimas. Las dos terceras partes o más de la cantidad total del hierro corporal están en el eritrón; cada mililitro de eritrocitos contiene aproximadamente 1 mg de hierro. La reserva de hierro está contenida en los macrófagos del sistema reticuloendotelial en forma de ferritina y de hemosiderina, una forma de almacenamiento más compleja con menor proporción de proteína que la ferritina.

En el plasma, el nivel total de hierro da un promedio de 110  $\mu\text{g}/\text{dl}$ . La mayor parte de esta cantidad está unida a la transferrina, que tiene capacidad para ligar 330  $\mu\text{g}$  de hierro/dl y por tanto, se halla aproximadamente saturada en una tercera parte. Una cantidad del hierro plasmático está unida a la ferritina. La ferritina plasmática da un promedio aproximado de 100  $\mu\text{g}/\text{l}$  en los varones.

La secuencia de acontecimientos de la anemia por deficiencia de hierro suele ser la siguiente: cuando la pérdida de sangre excede la absorción, existe un balance negativo de hierro. Se moviliza el hierro por almacenamiento, disminuyen los depósitos de hierro, se reduce la ferritina plasmática, aumenta la absorción de hierro y se incrementa la capacidad de fijación del hierro plasmático (transferrina). Esta fase se conoce como deplección de hierro. Después de que el almacenamiento de hierro se vacíe, la concentración de hierro plasmático desciende, la saturación de hierro plasmático se reduce por debajo del 15% y el porcentaje de sideroblastos disminuye en la médula. Como resultado de la falta de hierro para la síntesis de hem, la protoporfirina eritrocitaria aumenta. Esta segunda fase es la eritropoyesis ferropénica; es posible que no exista anemia. La tercera fase es la anemia ferropénica; además de las anteriores anomalías, resulta detectable la anemia. Esta es primero normocrómica y normocítica, gradualmente se vuelve microcítica y por fin resulta microcítica e hipocrómica.

Los datos clínicos pueden ser consecuencia de la causa subyacente de la propia pérdida de sangre, de las manifestaciones generales de la anemia o de la deficiencia de hierro. Los datos atribuibles probablemente a la ausencia de hierro hístico incluyen: parestesias, tales como entumecimiento y hormigueo; atrofia del epitelio de la lengua con sensación de quemazón o dolor; fisuras o úlceras en las comisuras de la boca; gastritis crónica, que provoca disminución de las secreciones gástricas, pero pocos síntomas; pica, que representa el deseo excesivo de comer sustancias anormales tales como polvo o hielo; uñas cóncavas o en forma de cuchara, y dificultad de deglución debida a membranas de tejido o estenosis parciales en la unión del esófago y la hipofaringe. Estas dos últimas características son relativamente infrecuentes. Así mismo, también puede producirse esplenomegalia, aunque no es normal.

Capacidad de fijación de hierro en el suero: el intervalo de referencia para los adultos es de 250 a 400  $\mu\text{g}/\text{dl}$ . En la anemia ferropénica, la capacidad de fijación de hierro total en el suero se incrementa. Es normal o reducida en la anemia por enfermedad crónica. Si la infección crónica coexiste con pérdida hemática crónica, la CFHT es posible que no aumente, incluso si el paciente se muestra ferropénico.

La relación entre el nivel sérico del hierro y la CFHT es el porcentaje de saturación de esta última. Normalmente esto representa entre un 20 y un 55% los valores inferiores al 15% indican eritropoyesis ferropénica. Normalmente se produce una intensa variación diurna en el nivel sérico del hierro; los niveles más altos se observan por la mañana y los más bajos a últimas horas del día. En consecuencia, para el diagnóstico de la ferropenia es mejor utilizar muestras de sangre obtenidas en ayunas y por la mañana. En recién nacidos con niveles suficientes de hierro son normales desde el segundo al duodécimo mes los intervalos de referencia algo inferiores del nivel sérico del hierro.

La anemia ferropénica normalmente debe distinguirse de otras anemias microcíticas o hipocrómicas, las cuales incluyen los rasgos de la talasemia, la anemia prolongada de enfermedad crónica y las anemias sideroblásticas. El hierro almacenado en la médula ósea y la ferritina sérica disminuyen en los casos de ferropenia y presentan valores normales o elevados en los demás casos.

El primer principio de la terapéutica es la identificación y corrección de la causa subyacente. Se administra hierro en su forma ferrosa por vía oral y en dosis aproximada de 200 mg al día, fraccionada en tres veces, lo cual aportará una absorción de 20 a 40 mg de hierro al día, y junto con el hierro producido por el recambio de los eritrocitos envejecidos resultará suficiente para incrementar la producción hasta un nivel superior a dos a tres veces lo normal.

Preparaciones bucales:

La preparación de elección es el sulfato ferroso. Cada tableta de 200 mg de la sal en polvo y cada tableta de 300 mg de la sal hidratada proporciona alrededor de 60 mg de hierro elemental. Para la mayoría de los pacientes con anemia por deficiencia de hierro, una dosis diaria de hierro elemental es de 100-200 mg, que la proporciona una tableta tres veces al día. La absorción de hierro aumenta si las tabletas se ingieren en ayunas y en lapsos mayores de 4 horas. Las reacciones al hierro incluyen náuseas y vómito, calambres abdominales, diarrea, constipación y ocasionalmente sudación y síncope. Los efectos colaterales casi invariablemente están relacionados con la dosis y no se deben a su preparación.

EQUIPO:

Centrífuga

Espectrofotómetro

Baño de agua a 45<sup>0</sup>C

MATERIAL:

- a) Biológico: Sangre obtenida en tubo Vacutainer de tapa roja sin anticoagulante
- b) De laboratorio: 5 Tubos de ensayo de 13 x 100 mm con tapón de hule
  - 1 Pipeta Pasteur con bulbo de hule
  - 2 Pipetas graduadas de 2 ml
  - 4 Pipetas graduadas de 1 ml
  - Amortiguador (tris-hidroximetil)aminometano 1.0 M a pH 8.3
  - Solución reductora (sulfato de metilaminofenol 30mM, hidrogenosulfito de sodio 162 Mm).
  - Reactivo de coloración (ácido batofenantrolindisulfónico, sal disódica 1.7 Mm)
  - Solución Patrón de hierro (2.5 mg/100ml)

**TÉCNICA:**

1. Obtener 6 ml de sangre que se dejará coagular para obtener suero.
2. Todo el material deberá estar perfectamente limpio, enjuagado con agua destilada y seco.
3. Montar la prueba de acuerdo al siguiente esquema:  
Pipetear en tubos de ensayo:

	<b>BLANCO DE SUERO</b>	<b>PROBLEMA</b>	<b>BLANCO DE REACTIVOS</b>
Suero	1.0 ml	1.0 ml	-----
Amortiguador	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml
Solución patrón	0.2 ml	0.2 ml	-----

Mezclar, tapar los tubos de ensayo y dejarlos en baño de agua durante 10 minutos a 37°C ó 45°C.

Solución reductora	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
Agua bidestilada	0.2 ml	-----	1.0 ml
Reactivo de coloración	-----	0.2 ml	0.2 ml

Mezclar, tapar nuevamente los tubos de ensayo y dejarlos en baño de agua 180 minutos a 37°C ó 90 minutos a 45°C. Después de enfriar a temperatura ambiente, medir las extinciones de los problemas frente al blanco de reactivos y las extinciones de los blancos de suero frente a agua bidestilada, a 535nm ó 546 nm.

**CÁLCULOS:**

Capacidad libre de fijación de hierro (535 nm) = (0.905 – Epr + EB ) X 552microgramos/100ml

Capacidad libre de fijación de hierro (546 nm) = (0.838 – Epr + EB ) X 596 microgramos/100 ml

Epr = Extinción del problema

EB= Extinción del blanco de suero

**CAPACIDAD TOTAL DE FIJACIÓN DE HIERRO** = Capacidad libre de fijación de hierro + concentración de hierro sérico

**NOTA:** Esta práctica se podrá llevar a cabo utilizando el kit que exista en el laboratorio de hematología en el momento actual para la capacidad de fijación de hierro.

**INTERVALOS DE REFERENCIA:**

**HOMBRES:**

Capacidad libre de fijación de hierro = 200-300 microgramos/100 ml

Capacidad total de fijación de hierro = 300- 400 microgramos /100 ml

**MUJERES:**

Capacidad libre de fijación de hierro = 150- 250 microgramos/100 ml

Capacidad total de fijación de hierro = 250- 350 microgramos/100 ml

FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA  
LABORATORIO DE HEMATOLOGÍA  
PRÁCTICA N0. 11  
“FRAGILIDAD OSMÓTICA DE LOS ERITROCITOS (FOE)”  
**DURACION: 02 HR**

**OBJETIVO(S):**

Que el alumno aprenda a realizar la determinación de la fragilidad osmótica de los eritrocitos, así como también su interpretación y correlaciones clínico-patológicas.

**FUNDAMENTO:**

La forma de disco bicóncavo del eritrocito normal, implica un exceso de extensión superficial con relación a su volumen, lo que le proporciona una gran capacidad de deformabilidad. Como la membrana eritrocitaria es semipermeable, cuando los eritrocitos son colocados en una solución hipotónica, el agua entra osmóticamente haciendo que aumente de volumen y toma la forma esférica. Con ello, la superficie disminuye respecto a su volumen dando a la célula cierto grado de rigidez que interfiere con el paso de la misma a través de pequeñas aberturas, por lo que fácilmente se rompe. Otro fenómeno adicional es la salida de hemoglobina, que es permitida por el estiramiento de la membrana eritrocitaria. En esta práctica se harán una serie de diluciones de cloruro de sodio, de concentración progresiva, en las que los eritrocitos problema se someterán a diferentes concentraciones y se valorará la concentración de cloruro de sodio que produce la hemólisis en comparación con una sangre normal.

**GENERALIDADES:**

La prueba de fragilidad osmótica es la prueba principal de confirmación del diagnóstico de esferocitosis hereditaria. Esta prueba es una medida de la resistencia del eritrocito, a la hemólisis por estrés osmótico, la cual depende principalmente del volumen de la célula, del área de su superficie y de la función de su membrana. Los eritrocitos se incuban en solución hipotónica de NaCl de concentraciones variables. Al disminuir la concentración de NaCl, los eritrocitos absorben agua en un esfuerzo para conservar o para lograr el equilibrio osmótico, y las células se hinchan hasta que se forma un esferocito. La captación adicional de agua produce una membrana porosa que permite la liberación de hemoglobina (hemólisis). Las células normales comienzan a hemolizar a concentraciones de NaCl cercanas a 0.50% y la hemólisis es completa a una concentración aproximadamente de 0.30% de NaCl. Debido a la disminución en la proporción de superficie a volumen, los esferocitos son incapaces de expandirse tanto como las células normales de forma discoide. Se necesita absorber muy poco líquido antes que las células se hemolicen. Los esferocitos también tienen aumento en la permeabilidad de la membrana, la cual contribuye al aumento de su fragilidad. Por tanto la lisis de los eritrocitos de la esferocitosis hereditaria comienza a concentraciones de NaCl mayores y se completa entre las de 0.5 a 0.4%.

La prueba de fragilidad osmótica es normal a menos que los esferocitos constituyen de 1 a 2% de la población de eritrocitos; por tanto, es posible que los pacientes con EH leve tengan una fragilidad osmótica normal. No obstante estas células muestran una hemólisis anormal muy notable cuando la sangre se incubaba durante la noche (24 hrs) a 37° C antes de

agregarse a la solución de NaCl. Debido al aumento en su sensibilidad, esta prueba de fragilidad osmótica incubada es la prueba más confiable de la esferocitosis hereditaria.

En la mayor parte de los laboratorios los resultados de la prueba de fragilidad osmótica se presentan en gráfica para mostrar el grado de fragilidad en comparación con lo normal. Un desplazamiento a la izquierda del normal en la curva indica aumento en la fragilidad osmótica, mientras que cuando es a la derecha señala disminución.

Se produce disminución de la fragilidad osmótica en la talasemia, en la anemia de las células falciformes y en los padecimientos vinculados con células blanco.

*ESFEROCITOSIS HEREDITARIA:* es un trastorno hereditario común de la membrana que afecta a uno de 5000 europeos del norte. Suele heredarse de manera autosómica dominante, aunque, raramente puede ser autosómica recesiva. Es un trastorno clínicamente heterogéneo caracterizado por hemólisis de leve a moderada. El defecto de la membrana es un trastorno de la interacción de proteína vertical que se caracteriza con mayor frecuencia por una deficiencia de espectrina. La deficiencia de espectrina puede ser una deficiencia primaria o una deficiencia secundaria a causa de adhesión defectuosa del esqueleto a la capa lipídica doble.

La intensidad de la hemólisis se correlaciona directamente con el grado de deficiencia de la espectrina. La membrana del eritrocito en la Esferocitosis Hereditaria tiene una disminución en los lípidos totales tanto antes como después de la esplenectomía. Los esferocitos carecen de la flexibilidad de las células normales, lo cual hace que queden atrapados en los cordones esplénicos. La gravedad clínica de la esferocitosis hereditaria varía entre las familias y aún entre pacientes en la misma familia. Cerca de 25% de los pacientes tiene enfermedad hemolítica compensada, no presenta anemia, la ictericia es reducida o está ausente y solo esplenomegalia leve. En contraste, unos cuantos pacientes son intensamente anémicos; la ictericia neonatal es común en este grupo. La ictericia se presenta especialmente con infecciones víricas. Los pacientes de más edad no tratados comúnmente desarrollan cálculos biliares pigmentados como consecuencia de un exceso en el catabolismo de la bilirrubina. En frotis los esferocitos presentan policromasia. También pueden encontrarse esferocitos en la anemia hemolítica inmunitaria adquirida. Con frecuencia el folato se agota en los estados hemolíticos crónicos. La hemólisis eritrocitaria refleja el trastorno adquirido en la expresión de las proteínas reguladoras del complemento sobre la membrana celular.

Los hallazgos de laboratorio son los de un proceso hemolítico extravascular crónica: evidencia de un aumento del catabolismo del pigmento, hiperplasia eritroide y reticulocitosis. La prueba directa de Coombs es negativa. Los eritrocitos poseen una característica fragilidad osmótica aumentada. En la extensión sanguínea, los esferocitos tienen un diámetro más pequeño y están más intensamente teñidos que las células normales. Su palidez central está reducida o ausente, y si está presente puede ser excéntrica. El VCM es normal y la CHCM está a menudo aumentada, lo cual refleja una disminución de la superficie celular.

El aumento de la fragilidad osmótica de la sangre recién extraída es característico, pero inespecífico; puede ocurrir en las anemias esferocíticas adquiridas. En las células de la esferocitosis hereditaria se produce una diferencia mayor en la fragilidad mediana que en las células controles normales. Se trata de una característica diagnóstica importante en la esferocitosis hereditaria.

La esferocitosis hereditaria es también llamada anemia hemolítica congénita e ictericia acolúrica familiar; el defecto se encuentra en el eritrocito, que es pequeño y redondeado. Se desconoce la lesión bioquímica exacta de los eritrocitos, pero se han descrito anomalías de la fosforilación intracelular y fosfolípidos anormales en la membrana provocando defecto de la bomba catiónica. Puede ocurrir anemia más grave en “crisis” frecuentemente asociada con infecciones, originando exacerbación de la hemólisis o hemólisis con aplasia sobreañadida de la médula ósea. A menudo hay antecedentes de ataques periódicos de ictericia. El bazo, por lo general, está crecido y la ictericia puede detectarse clínicamente. El dolor de vesícula debido a cálculos por pigmentos es relativamente frecuente. La concentración de hemoglobina por lo general es normal o está ligeramente reducida, pero descenderá mucho más durante una crisis. Hay microesferocitos en los frotis teñidos con el colorante panóptico; pueden distinguirse de otros microcitos por la mayor intensidad de su tinción debido a la mayor profundidad de hemoglobina en las células. También se encuentran macrocitos y células policromáticas y la cuenta de reticulocitos por lo general es del orden de 5 a 20%. La CMHC puede estar levemente aumentada. Los microesferocitos tienen fragilidad osmótica anormal aumentada; empiezan sus lisis en mayor concentración de solución salina que las células normales y la hemólisis se termina en una concentración más alta.

El tratamiento estará indicado si la anemia es de gravedad suficiente como para interferir con la vida normal o si hay síntomas debidos a cálculos pigmentarios vesiculares. La esplenectomía por lo general resulta en curación clínica. No se ha encontrado ningún otro tipo de tratamiento que sea de beneficio duradero.

**EQUIPO:**  
Centrífuga

**MATERIAL:**

- a) Biológico: Sangre obtenida con EDTA o de preferencia con Heparina
- b) De laboratorio: 16 Tubos de ensaye de 13 x 100 mm
  - 2 Pipetas graduadas de 5 ml
  - 1 Pipeta graduada de 0.2 ml
  - Gradilla
  - Solución salina al 1% tamponada, pH 7.4

**TÉCNICA:**

1. Se obtienen 5 ml de sangre venosa y se mezclan perfectamente.
2. Se colocan 16 tubos de ensaye en una gradilla y se numeran de izquierda a derecha.
3. Montar la prueba de la siguiente manera:

<b>NÚMERO DE TUBO</b>	<b>ML. DE SOLUCIÓN SALINA AL 1% TAMPONADA</b>	<b>ML. DE AGUA DESTILADA</b>	<b>CONCENTRACIÓN DE LA SOLUCIÓN (%)</b>
1	3.8	1.2	0.76
2	3.6	1.4	0.72
3	3.4	1.6	0.68
4	3.2	1.8	0.64
5	3.0	2.0	0.60
6	2.8	2.2	0.56
7	2.6	2.4	0.52
8	2.4	2.6	0.48
9	2.2	2.8	0.44
10	2.0	3.0	0.40
11	1.8	3.2	0.36
12	1.6	3.4	0.32
13	1.4	3.6	0.28
14	1.2	3.8	0.24
15	1.0	4.0	0.20
16	0.8	4.2	0.16

4. Mezclar el contenido de los tubos.
5. Agregar a cada tubo 0.2 ml de sangre. Invertir cuidadosamente cada tubo con papel parafilm, para asegurar la mezcla.
6. Las gradillas que contienen los tubos se dejan reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos.
7. Transcurrido el tiempo indicado se mezcla cuidadosamente su contenido y se centrifugan los tubos a 2,000 r.p.m. durante 5 minutos.
8. Examinar los tubos observando en qué punto comienza la hemólisis y en qué punto es completa. El menor indicio de color rojo en el líquido sobrenadante indica el inicio de la hemólisis de los glóbulos menos resistentes; la hemólisis completa queda indicada por una solución rojo claro y ausencia de eritrocitos residuales en el fondo del tubo o enturbiamiento al agitar el tubo ligeramente.

**INTERVALOS DE REFERENCIA:**

Hemólisis inicial = 0.40-0.44%    Hemólisis total = 0.28-0.32%

**INTERPRETACIÓN:**

Una fragilidad osmótica aumentada se encuentra en la esferocitosis hereditaria y en anemias hemolíticas idiopáticas adquiridas, en las cuales existe una tendencia a la esferocitosis . Por el contrario, una fragilidad osmótica disminuida o resistencia aumentada denota un aplastamiento excesivo de los hematíes; esto se observa en la talasemia, anemia de células falciformes, policitemia vera, hepatopatías, después de esplenectomía, anemia sideropénica, ictericia y en varias anemias en las que se encuentran codocitos.

**FRAGILIDAD OSMÓTICA EN DIVERSAS PATOLOGÍAS**

<b>PATOLOGÍA</b>	<b>HEMÓLISIS INICIAL</b>	<b>HEMÓLISIS TOTAL</b>
Esferocitosis hereditaria	0.68 ± 0.14	0.46 ± 0.10
Eritroblastosis fetal (Rh)	0.60 ± 0.06	0.40 ± 0.04
Anemia hemolítica adquirida	0.52 ± 0.04	0.42 ± 0.04
Eritroblastosis fetal (ABO)	0.50 ± 0.02	0.40 ± 0.02
Tóxicos químicos	0.50 ± 0.04	0.40 ± 0.04
Quemaduras	0.50 ± 0.04	0.40 ± 0.04
Policitemia vera	0.40 ± 0.02	0.28± 0.02
Anemia por deficiencia de hierro	0.38± 0.04	0.28± 0.02
Talasemia	0.38± 0.04	0.20± 0.06
Drepanocitosis	0.36± 0.02	0.20 ± 0.04

FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA  
LABORATORIO DE HEMATOLOGÍA  
PRÁCTICA N0. 12  
“OBSERVACIÓN DE CUERPOS DE HEINZ”  
**DURACION: 04 HR**

**OBJETIVO(S):**

Que el alumno aprenda a identificar correctamente los Cuerpos de Heinz, así como la utilidad diagnóstica en la interpretación de la prueba.

**FUNDAMENTO:**

Los glóbulos rojos deficientes en glucosa 6-fosfato deshidrogenasa o que contienen hemoglobinas inestables desarrollan numerosas inclusiones intraeritrocíticas de hemoglobina desnaturalizada, llamas Cuerpos de Heinz, cuando se exponen a acetilfenilhidrazina. Los Cuerpos de Heinz se tiñen de color púrpura cuando son expuestos a ciertos colorantes básicos como el cristal violeta. Se ven más fácilmente cuando los hematíes están ligeramente distendidos por suspensión en solución hipotónica.

**GENERALIDADES:**

Cuando se desnaturaliza la hemoglobina forma precipitados conocidos como corpúsculos de Heinz. Estos precipitados no se pueden detectar en los frotis secados al aire ambiental y teñidos con la técnica de Romanowsky, pero sí con la tinción vital con violeta de metilo o violeta de cresil, apareciendo los corpúsculos de Heinz de color púrpura intenso. Su tamaño varía entre 1 y 4  $\mu\text{m}$  de diámetro y a menudo se fija a la membrana eritrocitaria. Se tiñen también, aunque menos intensamente, como inclusiones de color azul pálido con las tinciones reticulocitarias, como por ejemplo, el nuevo azul de metileno.

La presencia de corpúsculos de Heinz en una muestra de sangre recién extraída indica:

- A) que se ha ingerido un medicamento o sustancia química oxidante en cantidades suficientes para superar los mecanismos protectores normales del eritrocito y desnaturalizar la hemoglobina.
- B) Que se ha ingerido un medicamento como la primaquina por un sujeto con deficiencia de G6PD, por lo que la hemoglobina no se protege de la desnaturalización oxidativa, o
- C) Que el sujeto tiene una hemoglobina inestable o talasemia.

Las variantes capaces de producir síntomas se conocen colectivamente como anemias hemolíticas congénitas con cuerpos de Heinz. La hemoglobina inestable se desnaturaliza y precipita bajo la forma de cuerpos de Heinz; éstos se fijan a la superficie interior de la membrana y disminuyen de esa manera la deformabilidad celular. La anemia de la anemia hemolítica congénita con cuerpos de Heinz suele ser normocítica y normocrómica. Puede presentarse una ligera disminución de la HCM y de la CHCM debido a la eliminación de hemoglobina de los eritrocitos como cuerpos de Heinz en el bazo. De manera clásica aumenta el número de reticulocitos. El frotis de sangre puede mostrar punteado basófilo, células fragmentadas y pequeñas células contraídas. La fragilidad osmótica suele ser anormal después de 24 horas de incubación. Pueden demostrarse cuerpos de Heinz

formados *in vivo* en la sangre periférica después de la esplenectomía; sin embargo, este hallazgo no es específico de los trastornos de hemoglobina inestable. Los cuerpos de Heinz también pueden demostrarse en las alteraciones de las enzimas eritrocíticas, que permiten la oxidación de la hemoglobina, en la talasemia, y después de la administración de fármacos oxidantes a personas normales. Los cuerpos de Heinz de las hemoglobinas anormales pueden generarse *in vitro* por incubación de los eritrocitos con azul de cresil brillante u otro agente reductor. Estas inclusiones intracelulares no se pueden demostrar con la tinción de Wright.

Las talasemias constituyen un grupo de padecimientos en los cuales hay un defecto heredado de la síntesis de hemoglobina. Los eritrocitos tienen acortada en forma moderada su vida media y por esta razón los trastornos se clasifican como anemias hemolíticas. Se caracterizan por una anemia hipocrómica con valor normal o elevado de hierro en el suero. La HCM y la CMHC son bajas y en ocasiones se observan cuerpos de Heinz. El defecto primario es en la síntesis de la cadena de globina, el cual puede ser de dos tipos principales,  $\alpha$  y  $\beta$ .

#### EQUIPO:

Microscopio

Baño de agua a 37°C

#### MATERIAL:

- a) Biológico: Sangre fresca obtenida con EDTA o heparinizada.
- b) De laboratorio: 2 Tubos de ensayo de 13 x 100 mm  
Pipetas graduadas de 0.1 y 2 ml  
2 Portaobjetos  
1 Cubreobjetos  
Aceite de inmersión  
Buffer de fosfatos 0.067 M , pH 7.6  
Solución de Acetilfenilhidrazina  
Solución de cristal violeta

#### TÉCNICA:

1. Para esta prueba se debe utilizar sangre fresca de menos de 1 hora de extraída, ya sea con EDTA o heparina, o bien sin anticoagulante.
2. Añadir 0.1 ml de sangre a 2 ml de solución de acetilfenilhidrazina. Mezclar inmediatamente y ventilar 2 ó 3 veces soplando a través de la pipeta.
3. Incubar la mezcla destapada en un baño de agua a 37°C durante 2 horas. Repetir la aireación y continuar la incubación durante 2 horas, o sea 4 horas en total.
4. Colocar una gota en solución de cristal violeta sobre un portaobjetos limpio, agregar una gota pequeña de la mezcla previamente incubada, mezclar y colocarle un cubreobjetos. Dejar reposar durante 5 ó 10 minutos.
5. Examinar la preparación húmeda con objetivo de inmersión en aceite y contar el porcentaje de eritrocitos que contienen 5 o más Cuerpos de Heinz, los cuales se tiñen de color morado.

### INTERPRETACIÓN:

En las personas normales el 30% o menos de los eritrocitos contienen 5 o más Cuerpos de Heinz.

FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA  
LABORATORIO DE HEMATOLOGÍA  
PRÁCTICA N0. 13  
“PREPARACIÓN DE HEMOLISADOS”  
**DURACION: 01 HR**

### OBJETIVO(S):

Que el alumno aprenda a preparar hemolisados a partir de sangre total y conozca su utilidad en el laboratorio.

### FUNDAMENTO:

Para muchas pruebas del laboratorio de hematología, en las que el producto que se va a analizar es la pura hemoglobina contenida en los eritrocitos, sin interferencia de plasma, leucocitos, plaquetas o membranas celulares eritrocitarias, es indispensable preparar una solución de dicha hemoglobina en agua, eliminando los “contaminantes” mencionados. Para ello, se lavan los eritrocitos y posteriormente se lisan con sustancias que por densidad nos permitan separar los restos celulares de la solución de hemoglobina, a esta solución se le denomina hemolisado.

### EQUIPO:

Centrífuga  
Mezclador tipo Vórtex

### MATERIAL:

- a) Biológico: Sangre obtenida con EDTA
- b) De laboratorio: Gradilla
  - Tubos de ensayo de 13 x 100 mm
  - Pipetas Pasteur
  - Pipetas serológicas de 5 ml
  - Agua destilada
  - Solución salina isotónica
  - Tetracloruro de carbono

### TÉCNICA:

1. Centrifugar la sangre obtenida con EDTA durante 5 minutos, a 3,000 r.p.m. y retirar el sobrenadante.
2. Lavar el paquete de eritrocitos, tres veces, con solución salina isotónica.
3. Después del último lavado, retirar el sobrenadante.
4. Agregar una cantidad de agua destilada igual al volumen del paquete eritrocitario y 1 ml de tetracloruro de carbono.
5. Agitar en el Vórtex o vigorosamente en forma manual, para producir la hemólisis.
6. Centrifugar por 10 minutos, a 1,000 r.p.m.
7. Con pipeta Pasteur, separar y conservar el hemolisado que queda como sobrenadante, teniendo cuidado de no tocar el estroma que queda en la interfase hemoglobina/tetracloruro.
8. El hemolisado obtenido puede conservarse en congelación por mucho tiempo.

INTERVALOS DE REFERENCIA:

No existen.

NOTA:

Existen diversos métodos para preparar hemolisados, sin embargo, se considera que éste es el más práctico, ya que es fácil y rápido de realizar y permite separar fácilmente la solución de hemoglobina sin contaminarse con el estroma, ya que con este método queda en la interfase y no en la superficie, como sucede con otros métodos.

FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA  
LABORATORIO DE HEMATOLOGÍA

PRÁCTICA N.º 14

“CUANTIFICACIÓN DE HEMOGLOBINA FETAL”

**DURACION: 01 HR**

**OBJETIVO(S):**

Que el alumno aprenda a medir correctamente los niveles de hemoglobina fetal en muestras de sangre, así como también conocer la utilidad diagnóstica de la medición de la misma.

**FUNDAMENTO:**

La hemoglobina fetal (hemoglobina F), principal hemoglobina del feto y del recién nacido, resiste a la desnaturalización por álcalis; la hemoglobina del adulto, así como la mayoría de las hemoglobinas humanas lo hacen. Una muestra de hemolisado problema se alcaliniza y después se neutraliza. La hemoglobina desnaturalizada puede ser extraída de la solución por filtración, después de la adición de sulfato amónico acidificado saturado a la mitad. Al filtrarse, se obtiene una solución que contendrá sólo la hemoglobina resistente a la acción del álcali y que puede ser medida fotocolorimétricamente a 540 nm y expresada como un porcentaje del total de hemoglobina.

**GENERALIDADES:**

La hemoglobina F se encuentra en los eritrocitos del feto y persiste en cantidades decrecientes durante los primeros meses de la vida. Difiere de la Hb A en que contiene cadenas  $\gamma$  en lugar de cadenas  $\beta$ . La diferencia en sus propiedades físicas consiste en que tiene mayor afinidad para el oxígeno, menos carga positiva en soluciones a pH a 8.6 y en su resistencia a la desnaturalización por los álcalis.

La mayor parte de pacientes con talasemia  $\beta$  menor tienen una cantidad de Hb F normal o sólo ligeramente aumentada. La persistencia hereditaria de Hb fetal, es un trastorno que no representa una variedad de talasemia ni ocasiona anemia hemolítica pero puede confundirse con la talasemia beta cuando coexiste con una anemia debida a otra causa, puede distinguirse de aquellas entidades por el hecho de que los glóbulos rojos de todos estos pacientes contienen Hb fetal, mientras que en los síndromes de talasemia, y en algunos otros tipos de stress hematológicos, solo una pequeña proporción de la población total de glóbulos rojos contiene dicha Hb. La Hb F se distribuye en forma heterogénea entre los eritrocitos en la talasemia B, según se determina por técnica citológica. Algunos hematíes contienen cantidades relativamente altas de HbF y otros sólo cantidades pequeñas.

**TALASEMIA MAYOR:** con ausencia o disminución de la producción de la cadena beta, la producción de la cadena  $\gamma$  se mantiene alta (el nivel de la Hb F es elevado), y se produce un exceso de cadenas  $\alpha$ . Los agregados de cadenas alfa son inestables y precipitan en el normoblasto o glóbulo rojo, lesionado las células. Como consecuencia, se eliminan precipitados y células, lo cual provoca una anemia hemolítica grave. Los hallazgos clínicos incluyen ictericia y esplenomegalia, que se hace evidente en la primera infancia. Los huesos faciales prominentes y los ojos oblicuos producen un aspecto mongoloide. Estos cambios y los hallazgos roentgenográficos de un adelgazamiento del córtex de los huesos

son largos y planos y de un cráneo engrosado y con osteoporosis reflejan la hiperplasia extrema de la médula ósea en respuesta al proceso hemolítico. La pubertad se retrasa y el individuo crece achaparrado. La mayoría de los pacientes requieren transfusiones regulares y experimentan problemas debidos a la sobrecarga de hierro. Normalmente se desarrolla hemocromatosis y el fallo cardíaco por siderosis del miocardio es la causa principal de muerte hacia el final de la tercera década.

En las talasemias B, la Hb F está presente en un 60 a 95%, con HbA. Aunque la HbA<sub>2</sub> puede estar o no aumentada, la relación de A<sub>2</sub> a A está siempre elevada. En los negros con talasemia B los hallazgos clínicos son menos graves y la transfusión no suele ser necesaria: la Hb F es de un 20 a 40%.

A diferencia de la mayoría de las enfermedades hemolíticas, esta anemia es hipocrómica y microcítica. Esto probablemente se debe al defecto de la síntesis de la hemoglobina. También se aprecia poiquilocitosis, con formas extrañas, células diana, ovalocitosis, anillos de cabot, corpúsculos de Howell-Jolly, fragmentos nucleares, siderocitos, anisocromía, anisocitosis y a menudo normoblastosis extrema. La poiquilocitosis es más llamativa en pacientes con el bazo intacto; la normoblastosis es más importante después de la esplenectomía. Los normoblastos tienen un citoplasma hipocrómico y, especialmente después de esplenectomía, agregados de hemoglobina de tinción muy densa que probablemente representa cadenas  $\alpha$  precipitadas.

En la talasemia menor la Hb F se halla ligeramente elevada en cerca de la mitad de los casos. Si la HbF excede del 5% es probable que exista también una persistencia hereditaria del gen de la hemoglobina fetal.

#### EQUIPO:

Centrífuga

Cronómetro

Espectrofotómetro

#### MATERIAL:

a) Biológico: Hemolisado de la muestra problema

b) De laboratorio: Gradilla

Tubos de ensayo de 13 x 100 mm

Pipetas Pasteur

Pipetas serológicas de 1 ml

Pipetas serológicas de 5 ml

Pipeta automática de 0.1 ml

Pipeta de Sahli con boquilla

Pipeta automática de 0.1 ml

Papel filtro Whatman No. 42 ó 44

Embudos de 5 a 7 cm de diámetro

Solución saturada de sulfato de amonio al 50%

Hidróxido de sodio N/12

**TÉCNICA:**

1. Colocar en un tubo de ensayo de 13 x 100 mm, 1.6 ml de KOH N/12.
2. Agregar 0.1 ml del hemolisado, echando a andar el cronómetro al mismo tiempo.
3. De inmediato, agitar continua y vigorosamente el tubo, durante 20 segundos.
4. Exactamente un minuto después de haber agregado el hemolisado, añadir 3.4 ml de la solución de sulfato de amonio saturado.
5. Agitar enérgicamente y filtrar con papel Whatman. El filtrado obtenido contendrá la hemoglobina fetal.
6. Preparar una solución de “hemoglobina total” poniendo en un tubo 5 ml de agua destilada, y con pipeta Sahli agregarle 0.02 ml del mismo hemolisado.
7. En espectrofotómetro a 540 nm, leer las densidades ópticas de cada tubo usando agua destilada como blanco.
8. Realizar los cálculos de la siguiente forma:

$$\% \text{ de Hemoglobina Fetal} = \frac{\text{D.O. del "filtrado"}}{\text{D.O. de hemoglobina total}} \times 0.203 \times 100$$

**INTERVALOS DE REFERENCIA:**

En la siguiente tabla se muestran los intervalos de referencia de acuerdo con la edad.

<b>EDAD</b>	<b>HEMOGLOBINA FETAL</b>
Recién nacido	70-90%
1 mes	50-75%
2 meses	25-60%
3 meses	10-35%
6 meses	6-8%
1 año	1-2%
Adulto	0-2%

**NOTA:**

La medición de la hemoglobina fetal es importante en la diferenciación de hemoglobinopatías o para evaluar las condiciones de estrés medular. Otra posible utilidad es en la valoración del paso de sangre fetal a la circulación materna en el postparto inmediato, que pudiera ser causa de isoimmunización cuando hay incompatibilidad de grupos.

FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA  
LABORATORIO DE HEMATOLOGÍA  
PRÁCTICA N0. 15  
“RECUENTO DE LEUCOCITOS”  
**DURACION: 02 HR**

**OBJETIVO(S):**

Que el alumno aprenda a efectuar el recuento de leucocitos utilizando el método manual o del hemacitómetro, el cual es una determinación básica en el laboratorio de hematología, así como también interpretar los resultados obtenidos.

**FUNDAMENTO:**

Los estudios cuantitativos de los elementos formes de la sangre se refieren a la concentración de cada uno de ellos en un microlitro (milímetro cúbico) de sangre. Para el recuento de leucocitos se efectúa la dilución exacta de la sangre con una solución hipotónica de ácido acético que destruye a los eritrocitos. El azul de metileno o violeta de genciana permite reconocer fácilmente el líquido y observar mejor a los glóbulos blancos, a los que tiñe ligeramente. Los eritroblastos no se destruyen por lo que se deben tomar en cuenta para corregir los resultados. El recuento se lleva a cabo en un volumen determinado de la muestra utilizando la cámara de Neubauer y posteriormente se hacen los cálculos.

**GENERALIDADES:**

En la sangre humana que se encuentra en estado normal pueden distinguirse, en orden de frecuencia los siguientes tipos de leucocitos: neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos. La producción de linfocitos se realiza en diferentes sitios, pero la de neutrófilos, monocitos, eosinófilos y basófilos ocurre exclusivamente en la médula ósea del ser humano normal. También se observan otros tipos leucocitarios como las células plasmáticas y los macrófagos en la médula ósea y en otros sitios.

La función principal de todo el sistema leucocitario es defender al organismo en contra de lo que es “ajeno”. No obstante, cada uno de estos tipos de células, tiene funciones diferentes y se comporta como un sistema independiente aunque relacionado con lo demás. El sistema leucocitario difiere del de eritrocitos y plaquetas en varios aspectos. La función de los dos últimos se realiza en la sangre, en tanto que las funciones de los leucocitos se efectúan en el espacio extravascular. Es por ello que la sangre sólo sirve como un medio para que los leucocitos puedan ir de un lugar a otro.

La cuenta total de leucocitos generalmente se mide en el hemacitómetro después de diluir la sangre total con un líquido especial, el cual separa los eritrocitos. Pueden emplearse contadores electrónicos. Las cuentas visuales son relativamente inexactas, hasta con 20% de error, pero los contadores electrónicos por lo general son precisos dentro de 1 a 2%.

TRASTORNOS VINCULADOS COMÚNMENTE CON CAMBIOS EN LAS CONCENTRACIONES DE LEUCOCITOS		
CELULAS	CONCENTRACION AUMENTADA	CONCENTRACION DISMINUIDA
<b>LEUCOCITOS</b>	Infecciones bacterianas Inflamación Intoxicación metabólica Hemólisis Hemorragia Necrosis tisular Después de ejercicio Extenuante Ansiedad o estrés Leucemia aguda Trastornos mieloproliferativos	Infecciones vírales Anemia aplásica Anemia megaloblástica Leucopenia inducida por Fármacos Síndromes mielodisplásicos

### VARIACIONES SANGUÍNEAS DE LOS LEUCOCITOS

A. *Factores que la afectan: especie, edad, sexo, raza, estado fisiológico, relación neutrófilo-linfocito.*

La respuesta de los leucocitos sigue los mismos principios en todas las especies, sin embargo, deben considerarse las particularidades de cada una de ellas. En general, las variaciones de los leucocitos sanguíneos ocurren rápidamente, por lo tanto, un examen de sangre representa la situación existente en el momento de extraer la muestra. La sangre es sólo una vía de paso de los leucocitos, especialmente de los granulocitos, hacia los tejidos, siendo los exámenes seriados la forma más precisa de evaluar procesos agudos.

El número total y diferencial de leucocitos es diferente para cada especie, al igual que la relación Neutrófilo: Linfocito (N: L). Es así como en el canino predominan los neutrófilos (3,5:1), lo mismo en el felino (1,8:1), en tanto que en el equino es (1:1) y en el bovino lo hacen los linfocitos (0,5:1).

En general las variaciones leucocitarias se clasifican en 3 grandes grupos:

- ⊗ Fisiológicas: Por efecto de parto, posprandial, ejercicio.
- ⊗ Reactivas: Es la respuesta frente a una enfermedad, siendo transitoria en el tiempo, asociada a la permanencia del patógeno en el organismo. Ejemplo, respuesta frente a una infección bacteriana.
- ⊗ Proliferativas: Se deben a una proliferación anormal, generalmente espontánea y fuera de los mecanismos del control normal de la producción celular. Ejemplo, neoplasia hemopoyética.

### *B. Variaciones leucocitarias fisiológicas.*

Generalmente en todas las especies es el resultado de la liberación de epinefrina, en la cual el pool marginal de neutrófilos y o linfocitos se moviliza a la circulación general, aumentando la cuenta de leucocitos, neutrófilos y o linfocitos.

### *C. Variaciones leucocitarias reactivas.*

Se manifiestan con una leucocitosis o una leucopenia, dependiendo del agente etiológico, de la magnitud de la respuesta y de la relación neutrófilo-linfocito. Los leucocitos son mucho más frecuentes y las leucopenia generalmente se asocian a un mal pronóstico.

 **Mecanismos de neutrofilia.** Existen tres causas principales de neutrofilia, la fisiológica o pseudo neutrofilia, la producida por estrés sistémico no inflamatorio y la desencadenada por un proceso inflamatorio propiamente tal.

- **Neutrofilia fisiológica o pseudo neutrofilia:** Se produce en condiciones de excitación, susto, ejercicio muscular, posprandial, o cualquier estado que produzca la liberación de catecolaminas (epinefrina y norepinefrina) y consecuentemente un aumento del flujo sanguíneo. Es un proceso de rápida aparición y de corta duración, donde ocurre una liberación de neutrófilos desde el “pool” marginal al circulante sanguíneo (demarginación). Esta respuesta se debe al efecto beta adrenérgico de la epinefrina, que causa aumento del AMP cíclico de las células endoteliales disminuyendo la adherencia de los neutrófilos a las paredes de los vasos. Puede ir acompañada de linfocitosis y muy ocasionalmente de eosinofilia y monocitosis.
- **Neutrofilia del estrés sistémico no inflamatorio:** Se produce por la liberación endógena de glucocorticoides, en estados de dolor, traumáticos, intervenciones quirúrgicas, o por la administración de corticoides exógenos. En este último caso la respuesta ocurre entre 4 a 8 horas de la inyección y persiste por 12 a 24 horas. Si la liberación endógena o la administración se mantienen en el tiempo la respuesta también perdura. Los corticoides aumentan la liberación de neutrófilos desde el comportamiento de reserva de la médula ósea hacia la circulación, y por otra parte, disminuyen la adherencia y marginación de los neutrófilos al endotelio vascular, disminuyendo la salida de estas células hacia los tejidos. Ello se traduce en un aumento del “pool” circulante de neutrófilos y una disminución de la reserva de médula ósea. Esta neutrofilia va acompañada de linfopenia, eosinopenia y monocitosis o monocitopenia dependiendo de la especie y el mecanismo de producción se verá más adelante.
- **Neutrofilia de la inflamación:** Los procesos inflamatorios, especialmente los de origen bacteriano cursan con neutrofilia. La magnitud de la neutrofilia está determinada por el balance entre la tasa de liberación desde médula y la demanda tisular. Al inicio del proceso inflamatorio, hay salida de neutrófilos desde la reserva de médula ósea; más adelante, aumenta la producción de estas células bajo el estímulo del factor estimulador de colonias granulocíticas y otros factores estimuladores derivados de linfocitos y macrófagos activados. A nivel medular, se produce un aumento del “pool” de

proliferación y maduración. En la sangre ocurre además una desviación a la izquierda o presencia anormal de neutrófilos inmaduros, que puede ser leve (baciliformes), regular o moderada (baciliformes y metamielocitos) y marcada (baciliformes, metamielocitos y mielocitos o más inmaduros), dependiendo de la etiología y la severidad del proceso patológico. Si la desviación a la izquierda va acompañada de una neutrofilia, siendo el número de células inmaduras inferior a las maduras, se interpreta como un proceso regenerativo, donde la médula tiene el tiempo suficiente para producir el número de células necesarias para cubrir las demandas tisulares de neutrófilos. En esta situación hay un aumento de la granulopoyesis, con una hiperplasia mieloide con aumento de la maduración de neutrófilos. La desviación a la izquierda es degenerativa, cuando ella va acompañada de neutropenia, o el número de neutrófilos inmaduros supera a las células maduras. Esto implica que la demanda tisular es mayor que la producción medular, o inhabilidad en la producción y retardo en la maduración de neutrófilos, liberándose células inmaduras por la depleción de neutrófilos segmentados. Neutrofilia también la desencadenan procesos no infecciosos, ya sea porque se liberan corticoides endógenos o porque existe un proceso inflamatorio o hay destrucción de tejidos, como ocurre en neoplasias, hemorragias agudas, crisis hemolíticas y desórdenes metabólicos como acidosis y síndrome urémico.

### **Mecanismos de neutropenia.**

Los mecanismos de neutropenia han sido menos estudiados y se presentan con menos frecuencia. En general, los principales son:

- **Neutropenia por reducción o secuestro de granulocitos sanguíneos:** Puede presentarse con una distribución igual o desigual de los compartimentos circulantes y marginales de estas células. Esta situación ocurre por ejemplo, en las etapas iniciales de la respuesta inducida por endotoxinas de bacterias Gram-negativas en casos de sepsis y en el shock anafiláctico. Se produce una activación del complemento y de otros mediadores plasmáticos de la inflamación, con marginación masiva y secuestro de neutrófilos en órganos como pulmón, hígado y bazo (aumento del pool sanguíneo marginal). Posteriormente ocurre una neutrofilia por liberación de células desde médula ósea.
- **Neutropenia por disminución de la sobrevivencia de los neutrófilos:** Este mecanismo puede desencadenarse por una etiología inmune o no inmune.
- **Neutropenia por salida repentina y excesiva de células a los tejidos:** Ocurre en infecciones severas sobreagudas, bacterianas. Debido a la excesiva demanda tisular, el tiempo de permanencia de los neutrófilos en circulación es corto y se produce un desbalance entre la producción y la utilización. Aparecen neutrófilos inmaduros en circulación (desviación a la izquierda degenerativa). Puede ocurrir eosinopenia, y el retorno de estas células y de los linfocitos a la normalidad indica recuperación del proceso.

- **Neutropenia por granulopoyesis inefectiva o disminuida:** en el humano ocurre en deficiencias de vitaminas B12-folato; Intensidad de la respuesta de neutrófilos frente a la severidad de un proceso patológico. La magnitud de la neutrofilia indica la intensidad de la repuesta y la extensión o el grado de desviación a la izquierda representa la severidad de la enfermedad, relacionada con la localización de la inflamación y la virulencia del agente patógeno. Inflamaciones localizadas purulentas (piometra) y necrosis tisular (quemaduras severas, infartos, trombosis) producen un aumento mayor de neutrófilos sanguíneos que las generalizadas.
- **Reacción leucemoide:** En algunos procesos inflamatorios localizados, se observa esta singular respuesta de los neutrófilos, que se caracteriza por leucocitosis extrema, desviación a la izquierda marcada y neutrofilia. El cuadro hematológico parece una leucemia granulocítica, sin embargo, la causa es distinta, generalmente bacteriana. El diagnóstico diferencial se realiza por la anamnesis, los signos clínicos y hemogramas seriados.
- **Cambios morfológicos en los neutrófilos:** La severidad de una infección bacteriana con liberación de toxinas, residuos tóxicos del metabolismo y productos de tejidos necrosados producen alteraciones morfológicas o “cambios tóxicos” en los neutrófilos, como basofilia difusa del citoplasma, citoplasma vacuolado, granulaciones azurófilas o tóxicas, cuerpos de Döhle, y células gigantes y de formas bizarras. Ellos se deben a alteraciones en la maduración celular o a efectos tóxicos degenerativos producidos por el agente patógeno.

#### Variaciones de los eosinófilos.

- **Eosinofilia:** Ocurre generalmente en enfermedades crónicas de tejidos que contienen gran cantidad de células cebadas como piel, pulmones, tracto gastrointestinal, útero, las cuales por diferentes estímulos (complejos Ag-IgE, componentes del complemento) liberan histamina de sus gránulos, ya que esta amina vasoactiva actuaría como quimiotáctica para los eosinófilos; además, se produce por el efecto de otras sustancias quimiotácticas para eosinófilos. Por ejemplo, se manifiesta en dermatitis crónicas, inflamaciones crónicas del aparato respiratorio y gastrointestinal. También se presenta eosinofilia, asociada a algunas reacciones de hipersensibilidad tipo I o inmediata (alergias), donde se produce gran cantidad de IgE, que interactúa con receptores de las células cebadas, liberándose grandes cantidades de histamina. Ciertos parasitismos también cursan con eosinofilia, tales como infecciones con filarias, áscaris y triquinias, siendo el mecanismo desencadenante la migración del parásito o la sensibilización a la proteína extraña con liberación de histamina. Cuando este elemento pasa a la circulación, los eosinófilos son liberados desde la médula ósea a la sangre y producidos en mayor cantidad en ella.
- **Eosinopenia:** De frecuente presentación en enfermedades agudas y en el estrés no inflamatorio, asociada a la liberación de corticoides. Ellos actuarían probablemente inhibiendo a la histamina (producción como liberación) y produciendo lisis celular intravascular. También ocurre eosinopenia durante el proceso inflamatorio agudo,

debido a la migración de los eosinófilos a los tejidos atraídos por factores quimiotácticos, unido a la escasa reserva medular y corta vida media de estas células en la circulación.

### **Variaciones de los linfocitos**

Considerando que los linfocitos recirculan, el número de ellos en la sangre es el reflejo del balance de células que entran y salen de la circulación, por lo tanto, una **linfopenia** o **linfocitosis** no representa una alteración de la linfopoyesis. Cambios en la tasa de recirculación, producción o destrucción pueden o no afectar la cuenta de linfocitos sanguíneos en la sangre.

- **Linfocitosis:** Se observa linfocitosis fisiológica de efecto pasajero en estados emocionales y estrés físico por el efecto de catecolaminas, junto a neutrofilia. Linfocitosis reactivas son poco frecuentes y ocurren en enfermedades crónicas. En general, puede observarse en el estado resolutivo de enfermedades infecciosas y en raras ocasiones, luego de estímulos antigénicos como vacunaciones.
- **Linfocitosis permanentes del tipo proliferativa** se observan asociadas a neoplasias linfoides.
- **Linfopenias:** el estrés no inflamatorio, con liberación de corticoesteroides, cursa con linfopenia, debido a que ellos producen, dependiendo de la especie, linfólisis en sangre y tejidos linfoides, redistribución de linfocitos, con paso a los órganos linfoides y alteraciones en la producción. Los linfocitos tienen receptores para corticoides en su citoplasma, los cuales actúan alterando la producción de estas células y su metabolismo. Linfopenia con disminución de la linfopoyesis también se manifiesta por efecto de drogas inmunosupresoras, irradiación y quimioterapia y en algunas inmunodeficiencias, donde está alterada la producción de estas células. Enfermedades crónicas, como nefritis intersticial crónica con uremia, puede cursar con linfopenia, por depresión del tejido linfoide. En el curso de ciertas enfermedades vírales agudas como distemper, hepatitis infecciosa y panleucopenia, se observa linfopenia debido a cambios en la superficie celular con linfólisis y secuestro en los órganos linfoides. Una linfopenia persistente en un individuo enfermo es de mal pronóstico, ya que indica un estado de estrés permanente.

### **Variaciones de monocitos**

El número de estas células en la sangre es bajo y es el resultado de la tasa de producción medular, mecanismos de regulación, distribución en los diferentes compartimentos y utilización en los tejidos.

- **Monocitosis:** En general, la monocitosis reactiva se asocia a enfermedades subagudas o crónicas. También se aprecia en enfermedades hemolíticas, como piroplasmosis equina, en enfermedades con necrosis tisular como piometra y en enfermedades granulomatosas crónicas como la tuberculosis.

- **Monocitosis proliferativa** se observan en las neoplasias monocíticas con aparición de células anormales e inmaduras en la circulación.
- **Monocitopenia:** Se observa en el estrés inflamatorio, por redistribución de monocitos en el “pool” marginal. Una administración permanente de corticoesteroides puede producir disminución de la producción.

#### EQUIPO:

Microscopio

Agitador de pipetas de Thoma

Contador de células

#### MATERIAL:

- a) Biológico: Sangre obtenida con EDTA
- b) De laboratorio: Pipetas de Thoma para leucocitos con boquilla  
Cámara de Neubauer  
Solución diluyente de Turk  
Gradilla  
Tubos de ensayo de 13 x 100 mm  
Pipetas serológicas de 5 ml

#### TÉCNICA:

1. Mezclar la sangre por lo menos 5 minutos.
2. Con la pipeta de Thoma para leucocitos, aspirar la sangre hasta la marca 0.5
3. Con la misma pipeta, y cuidando que no se salga la sangre, aspirar líquido de Turk hasta la marca 11. Es recomendable rotar la pipeta y hacerlo manteniéndola en posición vertical, para evitar la formación de burbujas, que afectarían la dilución que, en este caso, es de 1:20.
4. Eliminar el exceso de diluyente secando la punta con papel absorbente.
5. Agitar la pipeta, durante 60 segundos, en el agitador eléctrico para conseguir una suspensión uniforme.
6. Desechar las 3 ó 4 primeras gotas de la pipeta, limpiar la punta con papel absorbente y llenar la cámara de Neubauer.
7. Dejar reposar durante 2 minutos para permitir la sedimentación de los leucocitos.
8. Contar los leucocitos encontrados en los cuatro cuadros grandes angulares, que contienen cada uno 16 cuadros medianos, ver figura 8. Verificar que la distribución de las células sea homogénea con el objetivo de 10x, de lo contrario, repetir el procedimiento.
9. Multiplicar el número de leucocitos contados por 50 para obtener el total de glóbulos blancos por  $\text{mm}^3$  de sangre.

La fórmula utilizada para realizar los cálculos es la siguiente:

$$\frac{N \times 20 \times 10}{4} = N \times 50$$

DONDE:

N = Número de leucocitos contados

20 = Título de dilución

10 = Corrección de la profundidad de la cámara para ajustar el volumen a 1mm<sup>3</sup>

4 = Total de cuadros grandes contados

INTERVALOS DE REFERENCIA:

A continuación se muestran en la siguiente tabla los valores de referencia de acuerdo con la edad:

EDAD	SEXO	INTERVALOS (LEUCOCITOS/MM <sup>3</sup> )
Recién nacidos	F/M	9,000-30,000
1 a 2 años	F/M	6,000-18,000
3 a 10 años	F/M	4,000-13,500
11 a 60 años	F/M	5,000-11,000
Más de 60 años	F/M	5,000-10,000

NOTA:

A la existencia de cifras superiores a los intervalos de referencia se le denomina leucocitosis y a la disminución de los valores leucopenia. Se debe considerar que existen variaciones dadas por el mismo ritmo circadiano, el peso, el tabaquismo, el embarazo, la menstruación, el ejercicio físico y otras más.

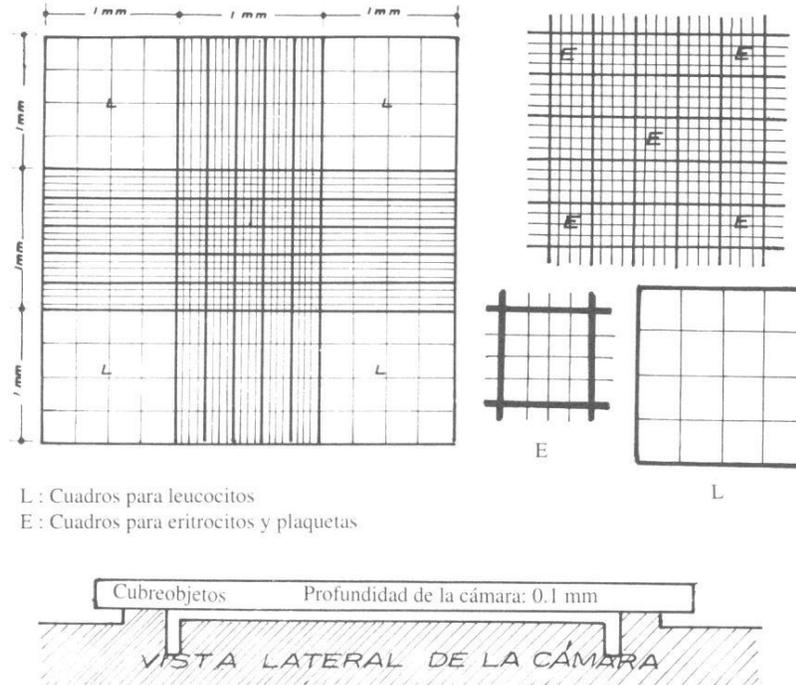


Figura 8

#### OBJETIVO(S):

Que el alumno aprenda a diferenciar los distintos tipos de células sanguíneas, ya que la información que se obtiene de examinar los extendidos sanguíneos puede ser inestimable para la atención del paciente, sugiriendo un diagnóstico y servir de orientación para el tratamiento. La calidad de los extendidos sanguíneos debe ser excelente.

#### FUNDAMENTO:

Los colorantes policromos de azul de metileno y eosina derivados del método original de Romanowsky sirven para la tinción diferencial de la mayoría de las estructuras normales y anormales de la sangre. La mayor parte se disuelven en alcohol metílico y combinan la fijación y la tinción. Se han ideado numerosos métodos para la preparación y aplicación de estos colorantes siendo los más conocidos los de Giemsa y Wright.

El colorante de Wright, es policromático porque produce varios colores. Es una solución de alcohol metílico de un colorante ácido (eosina) y otro básico (azul de metileno). Los núcleos y algunas otras estructuras de las células se tiñen con el colorante básico, por lo que se denominan basófilas; ciertas estructuras solo toman el colorante ácido y se llaman acidófilas, oxífilas o eosinófilas. Algunas otras estructuras se tiñen por una combinación de ambos y se denominan neutrófilas. El colorante de Wright es uno de los mejores y más empleados, permitiendo la identificación de los diferentes tipos de células sanguíneas.

#### GENERALIDADES:

Al preparar sangre para microscopia se extiende primero una gota pequeña sobre una laminilla de vidrio y se deja que seque. Se requiere mucha práctica y cuidado para obtener un buen frotis. Después del secado, se fijan las células y se tiñen. Se emplea metanol como fijador seguido de tinción con uno de los colorantes de Romanowsky. Estas tinciones se preparan a partir de mezclas de azul de metileno y eosina por métodos que involucran la producción de colorantes púrpura (azur), que son productos de la oxidación del azul de metileno. El colorante Leishman se emplea comúnmente en Inglaterra y el colorante de Wright en E.U.A.

Una vez diferenciados los linfoblastos en linfocitos, los monoblastos en monocitos, y los mieloblastos en polimorfonucleares o granulocitos (basófilos, neutrófilos y eosinófilos), la concentración de leucocitos totales en sangre se encuentra entre los 4500 y 11000 unidades por milímetro cúbico. En la médula ósea hay una gran reserva, de modo que puede triplicar este número. Esta reserva se moviliza (y se multiplica) en situaciones de estrés o en una infección. La división principal, los deja de la siguiente manera:

Leucocitos Granulocitos	Basófilos	Con sus respectivos colorantes se tiñen y presentan un citoplasma granulado.
	Neutrófilos	
	Eosinófilos	
Leucocitos Agranulocitos	Linfocitos	
	Monocitos	

**LEUCOCITOS:** se dividen en tres grupos: granulocitos, linfocitos y monocitos, por su aspecto en los frotis teñidos con el panóptico. Los granulocitos se subdividen en tres tipos: neutrófilos, eosinófilos y basófilos, dependiendo de la naturaleza de los gránulos en su citoplasma.

☼ **NEUTROFILOS:** el Neutrófilo es el leucocito más abundante en la sangre periférica del adulto, de 54 a 62%. Al nacer la concentración de Neutrófilo es de cerca de 60%; este nivel desciende a 30% hacia los 4 a 6 meses de edad. Después de los cuatro años de vida, la concentración de neutrófilos aumenta de manera gradual hasta los valores adultos, los cuales se alcanzan a los seis años de edad.

Una buena parte de las variaciones en el recuento total de leucocitos se debe a aumento o disminución en los neutrófilos.

El neutrofilo pasa por seis etapas morfológicamente identificables en el proceso de maduración desde la célula progenitora unipotencial hasta el neutrófilo segmentado funcional: 1) mieloblasto, 2) promielocito, 3) mielocito, 4) metamielocito, 5) granulocito en banda o no segmentado y 6) granulocito segmentado o neutrófilo polimorfonuclear (PMN). Aunque de tamaño semejante a la forma en banda, el neutrófilo polimorfonuclear es reconocido, como su nombre lo indica, por un núcleo segmentado con dos o más lóbulos conectados por un filamento nuclear delgado. La cromatina está condensada y se tiñe de color negro morado oscuro. Una gran parte de los neutrófilos tiene de 2 a 4 lóbulos nucleares. La presencia de más de cinco lóbulos es anormal y la célula se clasifica como PMN hipersegmentado. Con frecuencia los lóbulos se tocan o superponen entre sí, lo cual en ocasiones dificulta diferenciar entre célula en banda o PMN. El citoplasma del PMN maduro contiene muchos gránulos secundarios y se tiñe de color rosado. Pueden existir gránulos primarios pero debido a su escasez y pérdida en la calidad de tinción quizá no sean identificados con facilidad. La granulocitopenia define una disminución de todos los tipos de granulocitos, en tanto, la **neutropenia** es un término más específico que denota sólo una disminución de neutrófilos. Existe neutropenia cuando el recuento absoluto de neutrófilos cae por debajo de  $2.0 \times 10^9/L$ . En cambio cuando el recuento de neutrófilos cae por debajo de  $0.5 \times 10^9/L$ , el trastorno se llama agranulocitosis y el paciente se encuentra en alto riesgo de desarrollar una infección si no se aísla del ambiente normal. **Neutrofilia** es un término más específico que indica únicamente un aumento de neutrófilos y que se presenta cuando el recuento absoluto de neutrófilos excede  $7 \times 10^9/L$ .

<b>PADECIMIENTOS VINCULADOS CON TRANSTORNOS DE LOS NEUTROFILOS</b>	
<b>NEUTROPENIA</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Ciertas infecciones</li> <li>2. Todos los tipos de infecciones agobiantes</li> <li>3. Efecto de agentes físicos, sustancias químicas y fármacos</li> <li>4. Ciertos trastornos hematológicos y otros padecimientos de etiología desconocida o pobremente definida</li> <li>5. Caquexia y estados debilitantes (alcoholismo)</li> <li>6. En el choque anafiláctico</li> <li>7. Algunas son hereditarias</li> </ol>
<b>NEUTROFILIA</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Infecciones agudas, locales o generalizadas: especialmente por cocos.</li> <li>2. Otras inflamaciones: lesiones tisulares causadas por quemaduras o después de operaciones.</li> <li>3. Intoxicación metabólica, incluso uremia, acidosis diabética y eclampsia. Envenenamiento por sustancias químicas y fármacos.</li> <li>4. Hemorragia aguda, interna o externa</li> <li>5. Hemólisis aguda</li> <li>6. Neoplasias malignas</li> <li>7. Neutrofilia fisiológica: durante ejercicio extenuante</li> <li>8. Leucemia mielocítica</li> </ol>

⊗ **EOSINOFILOS:** generalmente se parecen a los neutrófilos, pero son algo mayores. El núcleo contiene 2 lóbulos y el citoplasma está apretujado con gránulos relativamente grandes de color rojizo-pardusco. Las concentraciones de eosinófilos se mantienen en 1 a 3% durante toda la vida. Es posible que no se aprecien eosinófilos en una cuenta diferencial de 100 células; sin embargo, el rastreo cuidadoso de la totalidad del frotis debe revelar la presencia de un eosinófilo ocasional. El eosinófilo maduro tiene un diámetro de 12 a 17  $\mu\text{m}$ . Por lo regular, el núcleo no tiene más de 2 o 3 lóbulos, y el citoplasma está completamente lleno de gránulos. Los gránulos se hallan limitados por una membrana fosfolípida y tiene una porción central cristalóide rodeada por una matriz. Estos gránulos contienen cuatro proteínas principales: proteína básica principal, proteína catiónica eosinófila, peroxidasa eosinofilia y neurotoxina derivada de eosinófilo.

- ⊗ Los eosinófilos tienen múltiples funciones biológicas y contribuyen a una diversidad de mecanismos de defensa inmunitaria. La eosinofilia se refiere a un aumento en los eosinófilos por encima de  $0.45 \times 10^9/L$ . Durante los primeros tres meses de vida se produce una ligera eosinofilia fisiológica. La eosinofilia reactiva parece ser inducida por sustancias secretadas por los linfocitos T. Haya diversos padecimientos vinculados con eosinofilia:

#### PADECIMIENTOS VINCULADOS CON EOSINOFILIA

Infeción parasitaria  
Trastornos alérgicos  
Infecciones  
Dermatitis  
Malignidades  
Enfermedad de la colágena  
Síndromes hipereosinofílicos idiopáticos  
Leucemia  
Trastornos gastrointestinales

- ⊗ **BASOFILOS:** los basófilos son las células menos abundantes en la sangre periférica, en cantidad de 0 a 1%. Es común no encontrar basófilos en un recuento diferencial de 100 células; sin embargo, el hallazgo de una basofilia absoluta es muy importante, ya que con frecuencia indica la presencia de malignidad hemática. Los basófilos son los granulocitos más pequeños. Los basófilos constituyen menos de  $0.2 \times 10^9/L$  de los leucocitos totales. Aunque son escasos, no son difíciles de identificar en un frotis de sangre. aun cuando los gránulos se deslavan, los pocos gránulos restantes que se tiñen profundamente son marcadores ciertos de identificación de esta célula. El basófilo y la célula cebada funcionan como mediadores de las respuestas inflamatorias, en especial de las de hipersensibilidad. Los basófilos se caracterizan porque liberan aminas biológicas (serotonina, histamina, etc.), de modo que promueven la vasodilatación y permeabilidad capilar. Los basófilos tienen un núcleo "arriñonado", aunque esta característica no les diferencia demasiado, y suelen distinguirse por la presencia de gránulos de color muy oscuro, en el citoplasma, tras una coloración con colorantes básicos.
- ⊗ La basofilia se refiere a un incremento de los basófilos por encima de  $0.15 \times 10^9/L$ . La basofilia se vincula con reacciones de hipersensibilidad inmediata. Los basófilos tienen receptores para IgE, la principal inmunoglobulina de los estados de hipersensibilidad. La basofilia se vincula con trastornos:

### Trastornos vinculados con basofilia

Trastornos mieloproliferativos crónicos  
Mielofibrosis con mataplasia mieloide  
Policitemia vera  
Leucemia mielógena

- ⊗ La basofilopenia, disminución de los basófilos es aún más difícil de establecer que la eosinopenia. Las disminuciones de basófilos se ven en las leucocitosis por infección, urticaria, inmediatamente después de la anafilaxia, en los estados inflamatorios, en las reacciones inmunitarias, alas neoplasias, la hemorragia y la terapéutica glucocorticoide.
- ⊗ **MONOCITOS:** Son los precursores de los macrófagos, se sintetizan en la médula ósea, y están en circulación durante aproximadamente 60 horas, tras las cuales pasan a los tejidos y se diferencian en los macrófagos. Tienen un tamaño parecido a los neutrófilos y en núcleo es grande, pero no cubre todo el contenido celular. Son los leucocitos de mayor tamaño en sangre; varía de 15 a 25 micras de diámetro. El núcleo tiene algunas muescas, lo dividen dos o tres lóbulos, pero puede tener otras formas. Posee una red de cromatina abierta y adquiere un color púrpura claro. El citoplasma es de color azul luminoso difuso y por lo general contiene pocos gránulos. A menudo la célula tiene forma irregular.
- ⊗ Se produce monocitosis cuando la cifra absoluta de monocitosis excede  $0.8 \times 10^9/L$ . Cuando se examina a un paciente con relación a monocitosis, es importante tomar en consideración su edad. Los monocitosis desempeñan una función importante en la inflamación y en las reacciones inmunitarias; por tanto, puede notarse un aumento en estas células en una amplia variedad de trastornos.

### Trastornos vinculados con monocitosis

Síndromes mieloproliferativos  
Enfermedades mieloproliferativas  
Policitemia vera  
Leucemia mielógena crónica  
Leucemias agudas  
Tumores linfoides  
Anemia hemolítica  
Púrpura trombocitopenia idiopática  
Neutropenia crónica  
Estado posesplenectomía  
Trastornos inflamatorios  
Malignidades no hemáticas  
Trastornos del sistema monocito-macrófago

⊗ Una concentración de monocitos por debajo de  $0.2 \times 10^9/L$  se conoce como monocitopenia. Se encuentra monocitopenia en los trastornos de la célula progenitora como la anemia aplásica. También se ve disminución en las cifras de monocitos en la leucemia de células peludas y después de la terapéutica con glucocorticoides.

⊗ **LINFOCITOS:** Son responsables de la inmunidad adquirida o específica. Hay varios tipos, pero destacan:

<b>Linfocitos</b>	Linfocitos B	Sintetizan anticuerpos	
	Linfocitos T	T helper	coadyuvantes
		T citotóxicos	citolíticos

Los linfocitos tienen el núcleo rico en RNA, de modo que su tinción es un poco más oscura. Son un poco más pequeños que los neutrófilos, y en general el núcleo ocupa casi toda la extensión celular. Las concentraciones anormales de linfocitos o la presencia de linfocitos anormales o reactivos proporcionan frecuentemente al clínico información importante para el diagnóstico, para dirigir los estudios subsecuentes o para iniciar la terapéutica apropiada, o varias de estas cosas. Los trastornos no malignos del linfocito o los cambios linfocíticos reactivos pueden ser adquiridos o congénitos y pueden afectar tanto a los linfocitos T como a los linfocitos B, o ambas poblaciones celulares.

⊗ En la mayor parte de los trastornos linfocíticos cuantitativos adquiridos, los linfocitos aumentan en cantidad. Existe linfocitosis en adultos cuando la cifra absoluta de linfocitos excede  $4 \times 10^9/L$ , y en niños cuando excede  $9 \times 10^9/L$ . Los linfocitos T constituyen de 60 a 80% de los linfocitos de la sangre periférica. Por tanto, los cambios en la concentración de estos linfocitos es más probable que causen aumentos o disminuciones en la cifra relativa de linfocitos que los cambios en los linfocitos B. La linfocitosis absoluta no suele acompañarse con leucocitosis, excepto en la mononucleosis infecciosa, linfocitosis infecciosas, infecciosa por Bordetella pertussis, citomegalovirus y leucemia linfocítica. La linfocitosis relativa secundaria a neutropenia es más común que la linfocitosis absoluta, y se presenta en una diversidad de infecciones vírales. Es importante diferenciar los trastornos benignos vinculados con linfocitosis de los trastornos benignos vinculados con linfocitosis de los trastornos linfoproliferativos neoplásicos.

<b>Trastornos vinculados con linfocitosis</b>	
Trastornos no neoplásicos	Trastornos neoplásicos
Mononucleosis infecciosa Infección por Bordetella pertussis Linfocitosis infecciosa Infección por citomegalovirus Toxoplasmosis Linfocitosis de célula B policlonal Persistente Infección viral Varicela Sarampión Paperas Rubéola infantil Hepatitis infecciosa Infecciones crónicas Sífilis terciaria Sífilis congénita Brucelosis Trastornos endocrinos Convalecencia de infecciones agudas Reacciones inmunitarias Enfermedades inflamatorias	Leucemia linfoblástica aguda Leucemia linfocítica crónica Leucemia de células peludas Linfoma Enfermedad de la cadena pesada

⊗ La linfocitopenia o disminución en el número de linfocitos, es una entidad más rara que la linfocitosis y no se ha estudiado de manera extensa. Se presenta linfocitopenia en adulto cuando la cifra de linfocitos es inferior a  $1.5 \times 10^9/L$  y en el niño cuando es menor de  $2 \times 10^9/L$ . La linfocitopenia puede resultar de la disminución en la producción, del aumento en la destrucción, de los cambios en la circulación del linfocito o de otras causas desconocidas.

<b>Trastornos vinculados con linfocitopenia</b>
Desnutrición Neoplasias diseminadas Enfermedades del tejido conjuntivo Quimioterapia Radioterapia Corticosteroides Trastornos inflamatorios agudos Infección crónica Enfermedades por inmunodeficiencia congénita Enfermedades por inmunodeficiencia adquirida Enfermedad renal aguda y crónica Estrés

#### EQUIPO:

Microscopio

Contador de células

Agitador mecánico de pipetas

#### MATERIAL:

a) Biológico: Sangre obtenida con EDTA para hacer extendidos sanguíneos.

b) De laboratorio: Aceite de inmersión

Portaobjetos

Puente de tinción

Pipeta de Thoma para glóbulos blancos con boquilla

Cámara de Neubauer

Colorante de Wright

Solución amortiguadora de fosfatos

Líquido de Turk

#### TÉCNICA:

1. Preparar frotis sanguíneos en portaobjetos.
2. Colocar el frotis con la extensión secada al aire hacia arriba en un puente de tinción.
3. Cubrir la extensión con líquido colorante mediante un gotero. Empléese suficiente cantidad de colorante con el fin de evitar la evaporación excesiva y la precipitación consiguiente, sin embargo tampoco debe ser tan abundante que rebose y se derrame.
4. Dejar reposar durante 5 minutos y añadir sobre el líquido colorante en la extensión una cantidad más o menos igual de solución amortiguadora con un segundo gotero. Para conseguir la mezcla del colorante con el diluyente se sopla con suavidad en varios puntos de la placa para establecer corrientes suaves igualando así la distribución. Dejar reposar 15 minutos, esperando la aparición de una capa metálica verdosa.
5. Quitar el colorante con un chorro de agua destilada, primero suave y luego más fuerte hasta que haya desaparecido todo exceso de aquel, manteniendo siempre horizontal la placa. El lavado tardará de 5 a 30 segundos.
6. Después del lavado, quitar el exceso de agua inclinando la placa y tocando con un papel secante el borde inferior. Limpiar la parte posterior del portaobjetos.
7. Secar las preparaciones al aire.
8. Si se utilizan cubreobjetos, montarlos con la extensión hacia abajo sobre un portaobjetos con bálsamo de Canadá o bien con una gota de aceite de inmersión.
9. Examinar minuciosamente la extensión con objetivo de inmersión en aceite. Clasificar cada leucocito y anotarlo ya sea con el contador o manualmente, hasta llegar a 100 células, obteniendo el porcentaje de cada tipo de células. Es indispensable observar los leucocitos en todas las zonas de extensión, ya que las diferentes clases pueden estar desigualmente distribuidas.
10. Efectuar un recuento total de leucocitos en la Cámara de Neubauer.
11. Calcular el valor absoluto(cifra absoluta) de cada variedad de leucocitos (No. De células/mm<sup>3</sup>), a partir del recuento total de leucocitos (el cual representará el 100%) y los porcentajes de cada tipo de leucocitos (valor relativo).

$$\text{Cifra Absoluta} = \frac{\text{Total de leucocitos} \times \text{Porcentaje}}{100}$$

**INTERVALOS DE REFERENCIA:**

Pueden existir grandes variaciones de acuerdo con la edad y el sexo, en la siguiente tabla se muestran los intervalos de referencia en adultos:

<b>TIPO DE LEUCOCITO</b>	<b>INTERVALOS O CIFRAS PORCENTUALES (%)</b>	<b>INTERVALOS O CIFRAS ABSOLUTOS/MM<sup>3</sup></b>
Linfocitos	20-45	1,500-4,500
Monocitos	4-9	200-800
Basófilos	0-1	0-100
Eosinófilos	1-4	40-440
Neutrófilos segmentados	40-65	2,500-7,000
Neutrófilos en banda	0-7	0-700

**NOTA:**

Se insiste en la importancia que tiene el reporte de cifras absolutas, pues de otra manera, la interpretación de un diferencial puede ser errónea; por ejemplo, si un paciente tiene 1,500 leucocitos/mm<sup>3</sup> de sangre y su diferencial muestra 50% de neutrófilos, la cifra porcentual aislada nos indicaría un valor normal de neutrófilos; sin embargo, al obtener la cifra absoluta, podemos apreciar que ese paciente tiene 750 neutrófilos/mm<sup>3</sup>, que es una cifra disminuida.

FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA  
LABORATORIO DE HEMATOLOGÍA  
PRÁCTICA N0. 17  
“CITOMETRÍA HEMÁTICA COMPLETA”  
(BIOMETRÍA HEMÁTICA COMPLETA)  
**DURACION: 03 HR**

**OBJETIVO(S):**

Que el alumno practique en conjunto todas las técnicas para efectuar una Citometría Hemática Completa, ya que ésta es una prueba fundamental en el laboratorio de hematología por la valiosa información que nos brinda sobre el estado general del paciente.

**FUNDAMENTO:**

Los descritos para cada determinación en prácticas anteriores.

GENERALIDADES:

Si bien la presencia de anemia en algunas ocasiones se sospecha por los antecedentes o la exploración física, la biometría hemática de rutina es en mucho la medida definitiva para conocer el estado del eritrocito. Incluso si se sospecha de anemia, es esencial la evaluación completa de laboratorio para validar el diagnóstico, determinar su gravedad y definir su naturaleza. El laboratorio de hematología ofrece un proceso de rutina o estándar relevante para el diagnóstico de anemia. El más importante de éstos es la biometría hemática completa que se lleva a cabo con un contador automático, la morfología de frotis sanguíneo, el índice de producción de reticulocitos y la evaluación del suministro de hierro. Por lo general, la biometría hemática completa y el frotis son de rutina, el índice de reticulocitos y el estudio de hierro se ordenan si se demuestra la anemia y su causa no es obvia.

La biometría hemática completa se lleva a cabo mejor con un contador automático capaz de hacer mediciones simultáneas de hemoglobina, número de eritrocitos, volumen de estos, cuenta plaquetaria, cuenta de leucocitos y cuenta diferencial de los leucocitos en 3 o 5 partes.

Una "Biometría Hemática" completa tiene por objeto corroborar los datos encontrados en la Historia Clínica, pudiendo detectar algún tipo de Anemia, ya sea intrínseca o por deficiencia en el aporte nutricional de hierro, ácido fólico, etc.

La biometría Hemática también denominada Hemograma, es uno de los estudios de rutina de mayor importancia, ya que la información que de aquí se deriva nos proporciona una idea muy confiable del estado general de la salud del paciente, consta de 2 bloques:

- ❑ Formula Roja: Determina los parámetros relacionados con el eritrocito.
- ❑ Formula Blanca: Determina los parámetros relacionados con los leucocitos.

### ☼ **Formula Roja:**

La determinación de la fórmula roja se compone de los siguientes parámetros:

- A. Hematócrito (Ht): Es el porcentaje de la sangre que está compuesta por eritrocitos.
- B. Hemoglobina(Hb): Es determinada la cantidad de esta proteína expresada en g./dl.
- C. Conteo eritrocítico(Eri): Es la cantidad total de eritrocitos circulantes por microlitro de sangre.

Algunos factores que afectan hematócrito, hemoglobina y conteo eritrocítico son:

#### 1. Cambios que inciden directamente en la circulación de eritrocitos:

Valor disminuido: Se denomina **anemia**, los tres parámetros disminuyen aunque este decremento puede ser desproporcionado cuando existen cambios en el tamaño eritrocítico y/o la cantidad de hemoglobina contenida en ellos, por lo que el cálculo e interpretación de los índices de la formula roja son de ayuda en estos casos.

Valor aumentado: Denominado policitemia, donde aumente el número de eritrocitos circulantes denominado policitemia absoluta, también puede darse un aumento transitorio en los eritrocitos circulantes denominado policitemia relativa (descritos posteriormente).

#### 2. Cambios en el volumen plasmático:

Valor aumentado: Se presenta en estados de deshidratación.

Valor disminuido: Se presentan en sobrehidratación con fluidos administrados parenteralmente dando una lectura que simula anemia.

D. Índices eritrocíticos: Determinados mediante cálculos matemáticos.

#### 1. Volumen Globular Medio (VGM): $(Ht. \times 10 / Eri)$ , Es el tamaño eritrocítico expresado en fentolitros y se comporta de la siguiente forma:

Valor aumentado: Se presenta en anemia macrocítica en la que la interferencia en la síntesis del ADN causa inhibición de la división celular y la resultante es la aparición de eritrocitos de gran tamaño (como ocurre en los casos de deficiencia de vitamina B12 y ácido fólico). También aumenta transitoriamente en los casos de reticulocitosis (anemia regenerativa).

Valor disminuido: Se presenta en casos de deficiencia de hierro

#### 2. Hemoglobina Globular Media (HGM): $(Hb. \times 10 / Eri.)$ , Se refiere a la cantidad de hemoglobina depositada en el eritrocitos expresada en picogramos.

Valor aumentado: En los casos de hemólisis tanto in vivo como in vitro; la hemoglobina extracelular también está implícita, aunque el índice asume que toda la hemoglobina es intracelular por lo que se debe interpretar con reservas. Durante la reticulocitosis permanece normal o ligeramente elevado.

Valor disminuido: En los casos de deficiencia de hierro.

3. Concentración de Hemoglobina Globular Media (CHGM):  $(Hb \times 100 / Ht)$  Es la cantidad de hemoglobina que está relacionada directamente con el eritrocito. Es el índice más preciso, ya que no requiere del conteo total de eritrocitos circulantes.

Valor aumentado: En los casos de hemólisis tanto in vivo como in vitro, así mismo puede incrementarse en los casos de esferocitosis marcada.

Valor disminuido: En los casos de reticulocitosis y deficiencias de hierro.

E. Morfología eritrocítica: Es determinada en el frotis sanguíneo.

1. Rouleaux: Es el agrupamiento de eritrocitos a manera de monedas amontonadas, es debido a una tendencia de sedimentación en forma paralela, trastorno que se relaciona con el incremento en la concentración de fibrinógeno y/o el cambio en las concentraciones de globulinas. En caninos y felinos puede presentarse en condiciones normales en un grado moderado y es muy marcada en casos de enfermedad inflamatoria y neoplasias. En equinos sanos es común desapareciendo en casos de anemia.

2. Agglutinación eritrocítica: Cuando se forma un acumulo de eritrocitos, ocurre generalmente en los casos de anemias inmunomediadas, puede ser observada en las paredes del tubo colector como pequeños grumos.

3. Anisocitosis: Es la variación en el tamaño de los eritrocitos donde aparecen macrocitos y/o microcitos a lado de células de tamaño normales, se presenta como respuesta en anemias de tipo regenerativo.

Macroцитos: Son eritrocitos de gran tamaño que provocan incremento en el VGM, (reticulocitos) aparecen generalmente en anemias regenerativas.

Microcitos: Son pequeños eritrocitos con un VGM disminuido que son observados en casos de anemias dadas por deficiencia de hierro y piridoxina generalmente.

4. Esferocitos: Son considerados microcitos que cuentan con una membrana celular reducida, lo que incrementa la permeabilidad hacia el sodio, son casi exclusivos de caninos y se presentan generalmente en anemias de tipo autoinmune y en anemias hemolíticas isoimunes así como después de una transfusión. Son removidas rápidamente de la circulación por los macrófagos esplénicos, debido a su falta de elasticidad y a que no están habilitadas para traspasar los poros capilares esplénicos.

5. Policromasia: Es una variación en la afinidad eritrocítica hacia el colorante, donde existe un tono azulado en las células que contienen residuos de ARN, eritrocitos que generalmente son grandes y se consideran reticulocitos. La presencia de policromasia está asociada con el incremento de la actividad eritropoyética como respuesta a una anemia, catalogada como regenerativa cuando está presente.

6. Hipocromia: Se refiere a la presencia de palidez marcada en la región central del eritrocito dado por la disminución en la concentración de hemoglobina dentro de la célula, la causa más común en la que se presenta es la deficiencia de hierro.

7. Poiquilocitosis: Son células anormales en su forma comúnmente encontradas en anemias debidas a la pérdida crónica de sangre o a enfermedades caracterizadas por fragmentación eritrocítica, células que son retiradas prematuramente de la circulación agudizando el estado anémico. Los acantocitos, son un tipo de poiquilocitosis.

8. Leptocitos: Son células delgadas que cuentan con una membrana celular grande observadas en enfermedades crónicas debilitantes que producen anemia.

9. Estomatocitos: Son eritrocitos con una forma oval hacia el centro que se observa en la estomatocitosis hereditaria del Alaska malamut y en enfermedades hepáticas.

10. Células en diana: Son células con forma de tiro al blanco que se presentan en anemias de tipo regenerativo junto con policromasia, aunque cuando se presentan y no existe policromasia se pueden relacionar con enfermedad renal, hepática o esplénica.

11. Cuerpos de Howell-Jolly: Son remanentes nucleares observados frecuentemente como consecuencia de un estado anémico en procesos regenerativos, no obstante si son numerosos pueden indicar hipoesplenismo.

12. Cuerpos de Heinz: Son estructuras localizadas en la membrana eritrocítica producto de la desnaturalización de la hemoglobina causada por la acción oxidante de ciertas drogas o químicos, estos cuerpos desorganizan la membrana eritrocítica y se asocian con hemólisis intravascular.

13. Cuerpos eritrocíticos refráctiles: Se localizan en estados normales en aproximadamente el 10% de los eritrocitos del gato, se incrementan en la presencia de diversas enfermedades, en muchas ocasiones juegan un papel importante en el desarrollo de la anemia.

14. Eritrocitos nucleados (Rubrocitos y Metarrubrocitos): Se deben a la liberación de células eritroides inmaduras hacia la circulación sanguínea en los casos de anemia, aunque pueden ser observadas en casos de enfermedad de la médula ósea donde existe daño en el parénquima que afecta la barrera capilar, así como en casos de leucemia.

F. Velocidad de Sedimentación globular media (Wintrobe): Es la precipitación de los eritrocitos en un lapso de tiempo estandarizado (1 hora), se relaciona directamente con la

tendencia eritrocítica hacia la formación de Rouleaux así como a la concentración plasmática de globulinas y fibrinógeno.

#### G. Determinación de plaquetas:

Son estructuras producidas por los megacarioocitos en la médula ósea mediante el proceso de fragmentación citoplasmática, juegan un papel muy importante en la hemostasis, su variación puede ser:

1. Trombocitopenia: Disminución en el número de plaquetas circulantes, generalmente acompañada con severos problemas de coagulación, se puede deber a:

- Destrucción plaquetaria que excede la producción ocurrida en trombocitopenias inmunomediadas (autoinmunes, isoimunes o inducidas por drogas), Lupus Eritematoso, hiperestrogenismo, Afecciones por Ehrlichia, enfermedad causada por Riketsia, o secuestro esplénico, así como neoplasias como hemangiosarcoma.
- Fallas en la producción plaquetaria que ocurre en anemias aplásticas, enfermedad de la médula ósea y quimioterapia citotóxica. Además la trombocitopenia puede dar un cuadro de coagulación intravascular diseminada, un síndrome que casi siempre acompaña a una enfermedad sistémica.

2. Trombocitosis: Incremento del número plaquetario.

- Ocurre en procesos parasitarios donde intervienen parásitos succionadores de sangre y en casos de neoplasia.
- Usualmente acompaña a anemias por deficiencias de hierro.
- Siempre que existan trastornos en la cuenta plaquetaria se debe considerar la determinación de parámetros que intervienen en la coagulación sanguínea.<sup>(2)</sup>

La alta frecuencia con la que se solicita y se realiza este estudio, hace olvidar en ocasiones la gran cantidad de información que se puede obtener de él, y que puede dividirse en información cuantitativa y cualitativa.

Las determinaciones cuantitativas obtenidas en una biometría hemática son:

- ⊗ Hemoglobina en g/dL (Hb),
- ⊗ Hematócrito (Ht);
- ⊗ Núm. de eritrocitos/ $\mu$ L,
- ⊗ Volumen globular medio (VGM) en fl,
- ⊗ Concentración media de hemoglobina corpuscular (CMHC) en (g de Hb) /dL de eritrocitos),
- ⊗ Hemoglobina corpuscular media (HCM) en pg de Hb/eritrocito,

⊗ % de reticulocitos y núm. absoluto de reticulocitos / $\mu$ L,

⊗ Núm. de leucocitos totales/ $\mu$ L,

⊗ % y núm. absoluto de cada tipo de leucocito/ $\mu$ L y

⊗ Núm. de plaquetas/ $\mu$ L.

La llamada serie blanca o leucocitaria es constituida por los glóbulos blancos o leucocitos. Dentro de esa serie se evalúa el número de leucocitos, además de eso, se hace la diferenciación celular.

El cuadro hemático permite sospechar cuadros agudos infecciosos y/o inflamatorios, problemas específicos de la sangre como las anemias y/o también procesos graves como las fallas del sistema de defensa o los procesos cancerosos tipo leucemias, y así, su utilidad clínica resulta invaluable.

#### EQUIPO:

Microscopio

Agitador mecánico de pipetas

Contador para células

Espectrofotómetro con celdas

Microcentrífuga

Lector para microhematócrito

#### MATERIAL:

a) Biológico: Sangre obtenida con EDTA

b) De laboratorio: 1 Pipeta de Thoma para glóbulos rojos con boquilla  
1 Pipeta de Thoma para glóbulos blancos con boquilla  
1 Pipeta de Sahli con boquilla  
1 Pipeta graduada de 5 ml  
1 Cámara de Neubauer con cubreobjetos  
1 Tubo de Wntrobe  
Tubos capilares para microhematócrito  
1 Pipeta Pasteur con bulbo de hule  
Portaobjetos  
Puentes de tinción  
Solución de Gower  
Líquido de Turk  
Solución Drabkin (Cianometa)  
Solución estándar de hemoglobina  
Colorante de Wright  
Solución amortiguadora de fosfatos

### TÉCNICA:

Para realizar una citometría hemática completa deberán efectuarse 2 partes: la fórmula roja y la fórmula blanca, las cuales comprenden las siguientes determinaciones, cuyas técnicas ya fueron descritas en las prácticas anteriores.

### FÓRMULA ROJA:

- A) Recuento de glóbulos rojos
- B) Determinación de hematócrito
- C) Determinación de hemoglobina
- D) Cálculo de los “Índices eritrocíticos”, que se lleva a cabo mediante las siguientes fórmulas de Wintrobe:

$$1. \text{VCM (Volumen Corpuscular Medio)} = \frac{\text{Hematócrito} \times 10}{\text{No. De eritrocitos (en millones por mm}^3\text{)}}$$

Se expresa en micras cúbicas o femtolitros (fl) y representan el volumen medio de los hematíes individuales. Es muy importante ya que determina el tamaño de los eritrocitos y nos orienta sobre el tipo de anemia, pudiendo ser: normocítica, microcítica y macrocítica, todo esto dependiendo de los intervalos de referencia que van de: 82-98 fl.

$$2. \text{HCM (Hemoglobina Corpuscular Media)} = \frac{\text{Hemoglobina (g/dl)} \times 10}{\text{No. De eritrocitos (en millones/mm}^3\text{)}}$$

Se expresa en picogramos(pg) o micromicrogramos y representa el contenido medio en peso de hemoglobina en un hematíe individual. Intervalos de referencia: 27-33 pg.

- 3. CCMH (Concentración Corpuscular Media de Hemoglobina)

$$\text{CCMH} = \frac{\text{Hemoglobina (g/dl)} \times 100}{\text{Hematocrito}}$$

Este índice nos indica el color de los hematíes, por lo que cuando estamos ante una anemia, la podemos clasificar en: Normocrómica, Hipocrómica e Hiperocrómica, dependiendo de los resultados obtenidos y en base a los valores de referencia. Se expresa en % ó en g/dl y representa la concentración media de hemoglobina por 100 ml de hematíes concentrados. Intervalos de referencia: 31-35%.

### FÓRMULA BLANCA:

- A. Recuento de leucocitos
- B. Recuento diferencial de células blancas o hemograma (valores relativos y absolutos).

### NOTA:

El mejor índice para evaluar la presencia de hipocromia , normocromia e hipercromia, es usar contadores automáticos. No tiene gran valor, cuando se utilizan métodos manuales, por la gran variabilidad existente en el recuento de eritrocitos efectuado en la Cámara de Neubauer, que como se comentó en anteriores prácticas tiene un error del 10 al 15%.

## CÉLULAS SANGUÍNEAS NORMALES EN SANGRE PERIFÉRICA



Carrillo-Farga, Joaquín, Pérez-Vega, Sonia (1999). **“Hematología para el Químico y el Patólogo Clínicos” XIV. Maduración de los monocitos.** Laborat-acta 4. Archivos Mexicanos de Laboratorio.

Figura 2. Mielocito eosinófilo mostrando gránulos azurófilos, gránulos grises y gránulos eosinófilos.

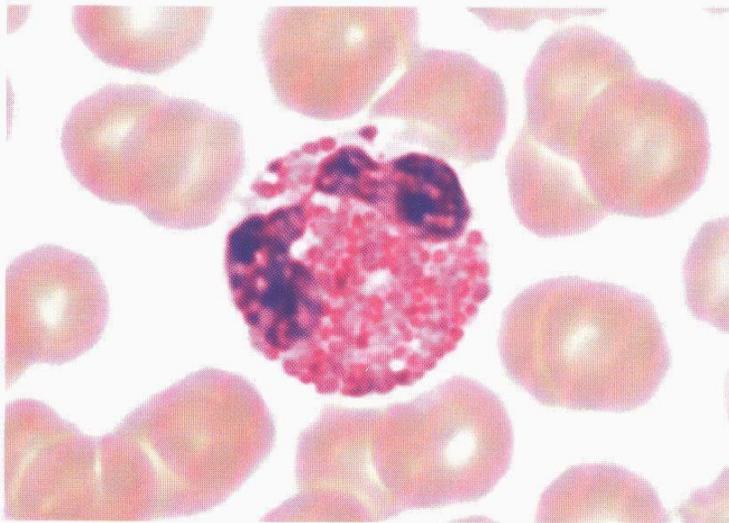
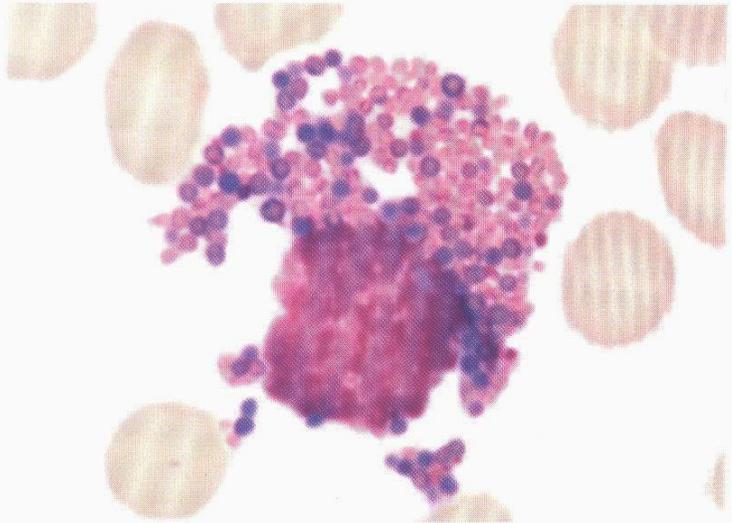
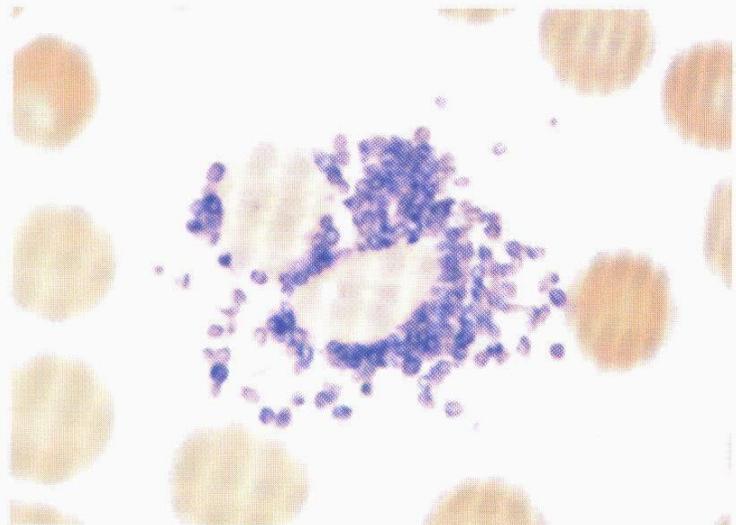


Figura 3. Eosinófilo segmentado, con un núcleo bilobulado, simétrico y gránulos eosinófilos.

Figura 4. Eosinófilo segmentado mostrando gránulos de color azul, positivos con la tinción citoquímica para mieloperoxidasa.



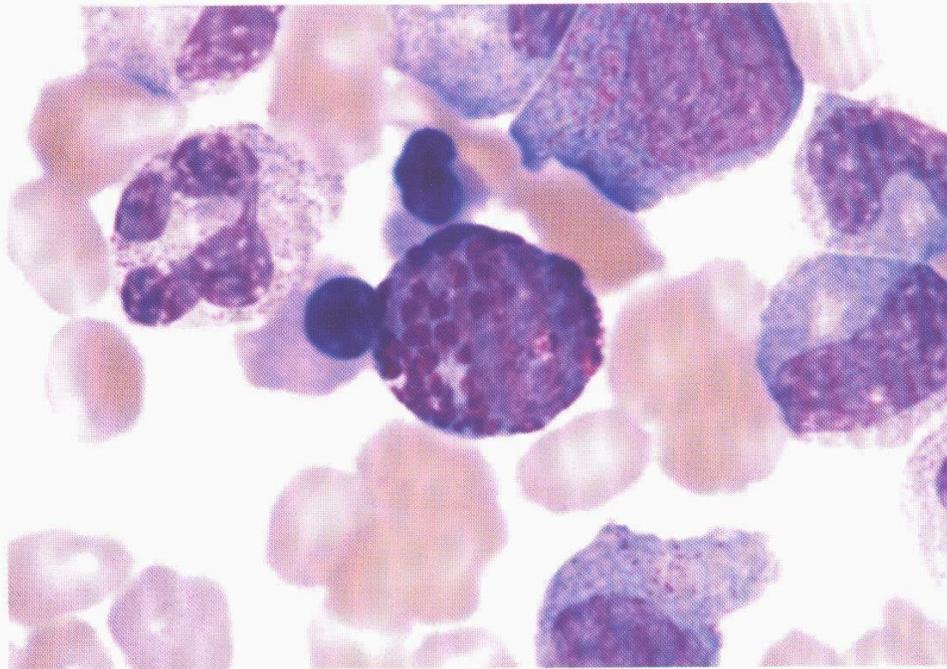


Figura 3. Metamielocito basófilo, mostrando gránulos basófilos característicos de contorno irregular y de tamaño variable (médula ósea normal).

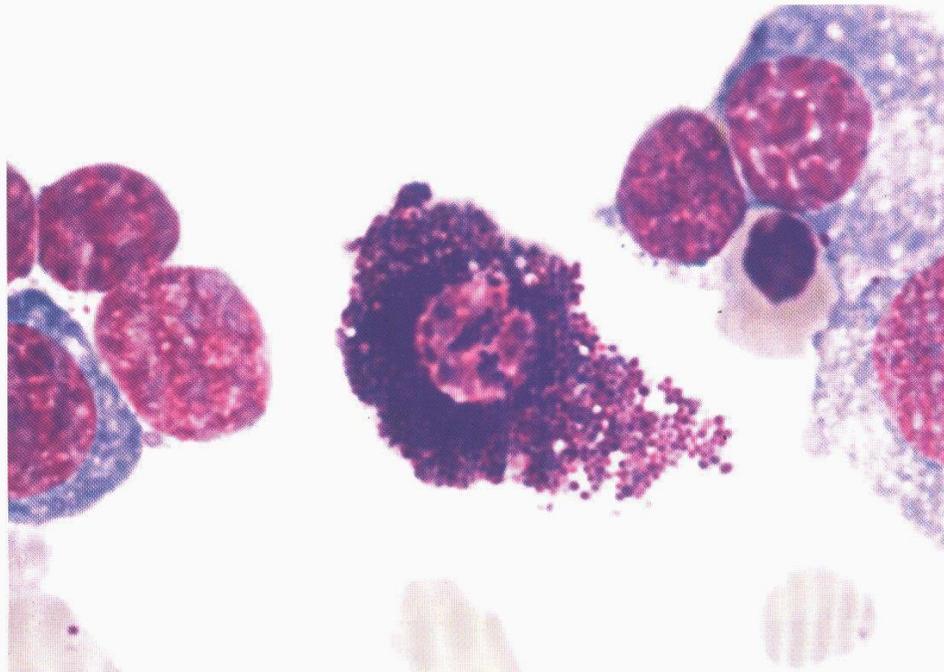


Figura 4. Célula cebada madura, con gran cantidad de gránulos de tamaño uniforme y núcleo claro, oval.

Carrillo-Farga, Joaquín, Pérez-Vega, Sonia (1999). “**Hematología para el Químico y el Patólogo Clínicos**” XIII. **Maduración de los Basófilos y las células cebadas**. Laborat-acta 3. Archivos Mexicanos de Laboratorio.

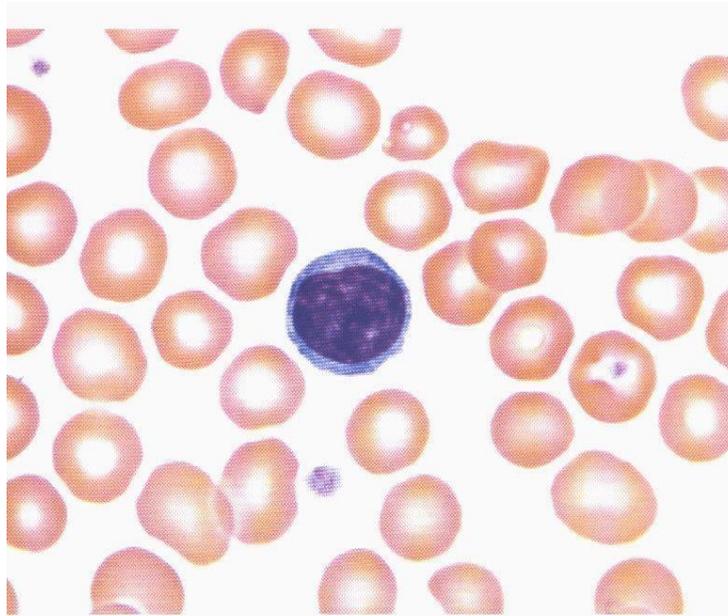


Figura 5. Linfocito pequeño en la sangre de un sujeto normal. La célula es pequeña, con cromatina gruesa, sin nucleolos y con escaso citoplasma basófilo. No es posible decir si se trata de un linfocito B o T (Wright, 1000x).

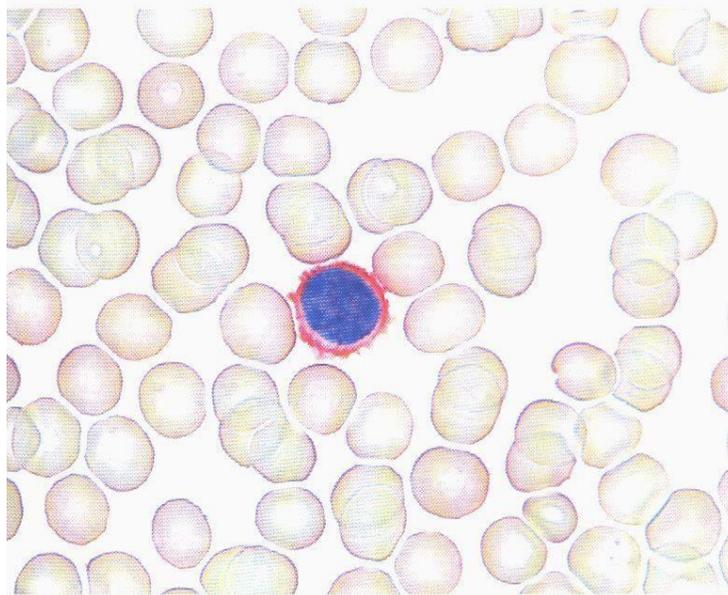
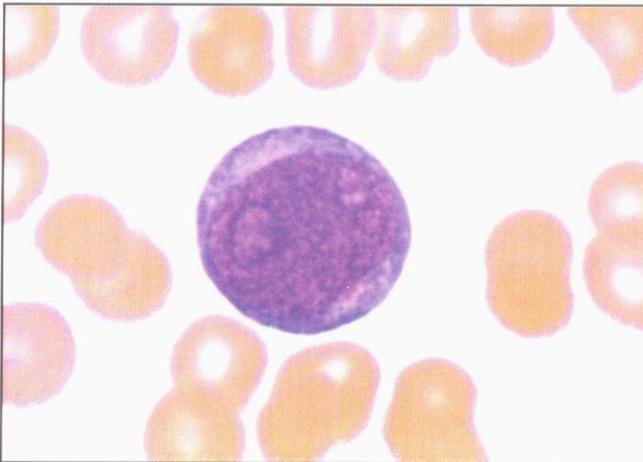
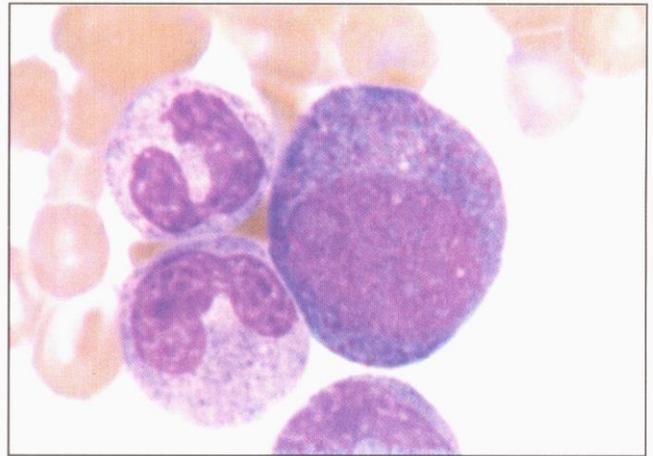


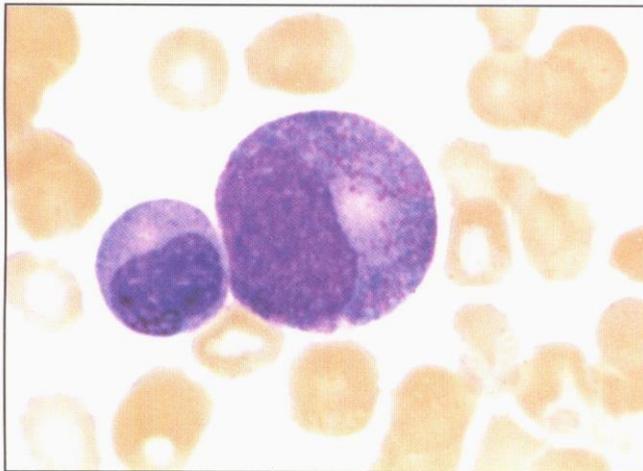
Figura 6. Linfocito pequeño en la sangre de un sujeto normal. Esta célula corresponde a un linfocito B porque es positivo (color rojo) con la tinción inmunocitoquímica para CD20 (Inmunofosfatasa alcalina, 1000x).



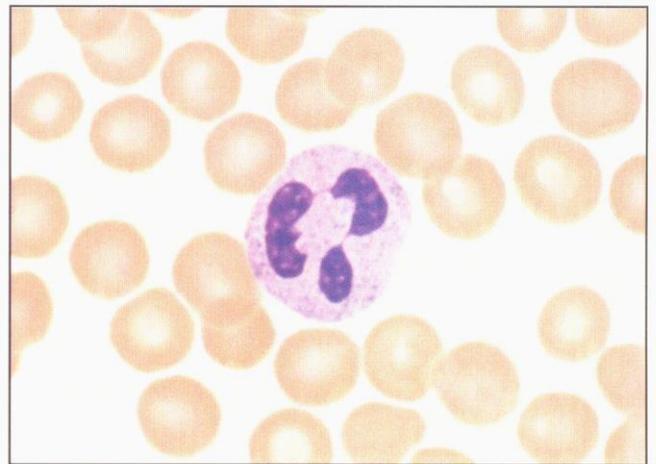
**Figura 1.** Mieloblasto normal en la médula ósea. La célula es de mediano tamaño y muestra un citoplasma basófilo, sin gránulos. La cromatina es fina y se observan dos nucleolos bien demarcados. Técnica de Wright.



**Figura 2.** Promielocito neutrófilo y dos formas en banda. El promielocito es una célula grande, con citoplasma basófilo que muestra abundantes gránulos azurófilos. El núcleo tiene cromatina fina y un nucleolo bien demarcado. Técnica de Wright.

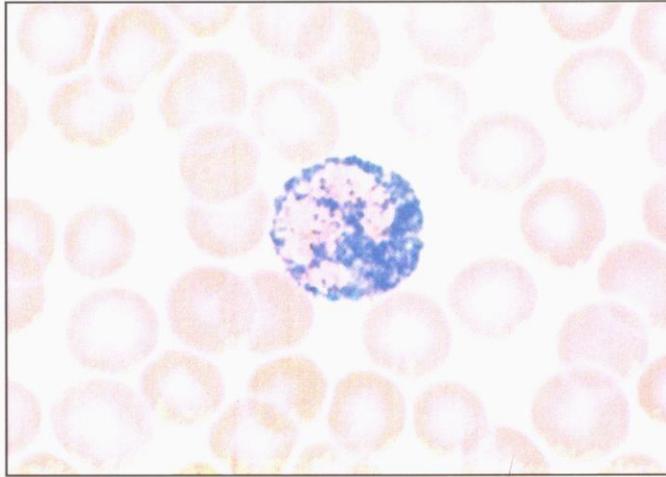


**Figura 3.** Mielocito neutrófilo. Corresponde a la célula de mayor tamaño. El núcleo está achatado y casi en su totalidad se encuentra en el lado izquierdo de la célula. En el centro celular se observa una zona clara que corresponde a los primeros gránulos neutrófilos en formación. El resto del citoplasma es basófilo y muestra aún gránulos azurófilos. La célula más pequeña es un metamielocito. Técnica de Wright.



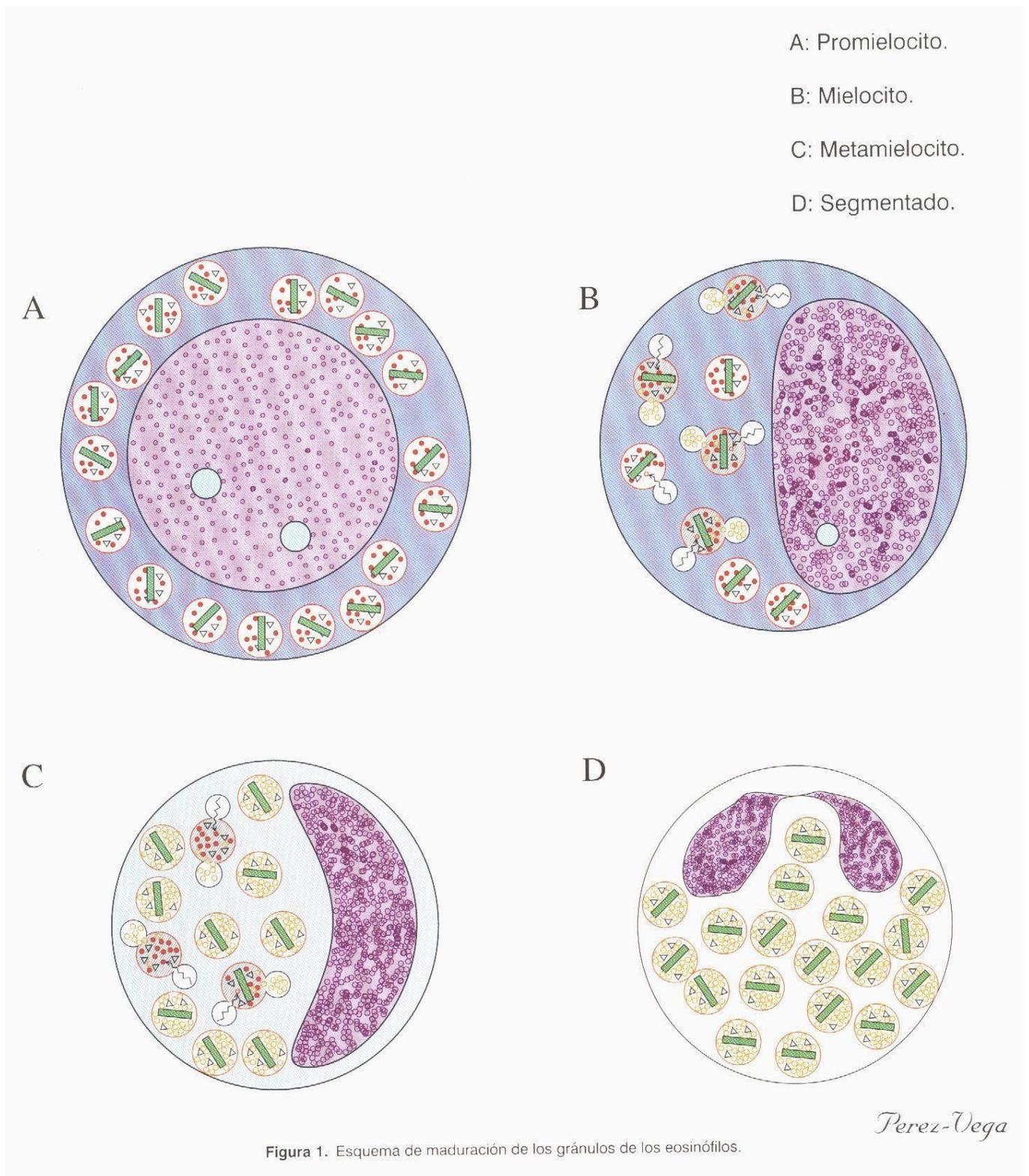
**Figura 4.** Neutrófilo segmentado. El citoplasma es de color rosa muy pálido y muestra exclusivamente gránulos de color gris (neutrófilos). El núcleo muestra tres segmentos de diferente tamaño y forma, unidos por filamentos muy delgados. Técnica de May-Grünwald-Giemsa.

Carrillo-Farga, Joaquín, Pérez-Vega, Sonia (1999). **“Hematología para el Químico y el Patólogo Clínicos” XI. Maduración de los Neutrófilos.** Laborat-acta 1. Archivos Mexicanos de Laboratorio.



**Figura 5.** Neutrófilo segmentado teñido con la técnica citoquímica para mieloperoxidasa. Se observan numerosos gránulos positivos de color azul.

Carrillo-Farga, Joaquín, Pérez-Vega, Sonia (1999). **“Hematología para el Químico y el Patólogo Clínicos” XI. Maduración de los Neutrófilos.** Laborat-acta 1. Archivos Mexicanos de Laboratorio.



Carrillo-Farga, Joaquín, Pérez-Vega, Sonia (1999). “Hematología para el Químico y el Patólogo Clínicos” XII. Maduración de los Eosinófilos. Laborat-acta 2. Archivos Mexicanos de Laboratorio.

Joaquín Carrillo-Farga y Sonia Pérez-Vega

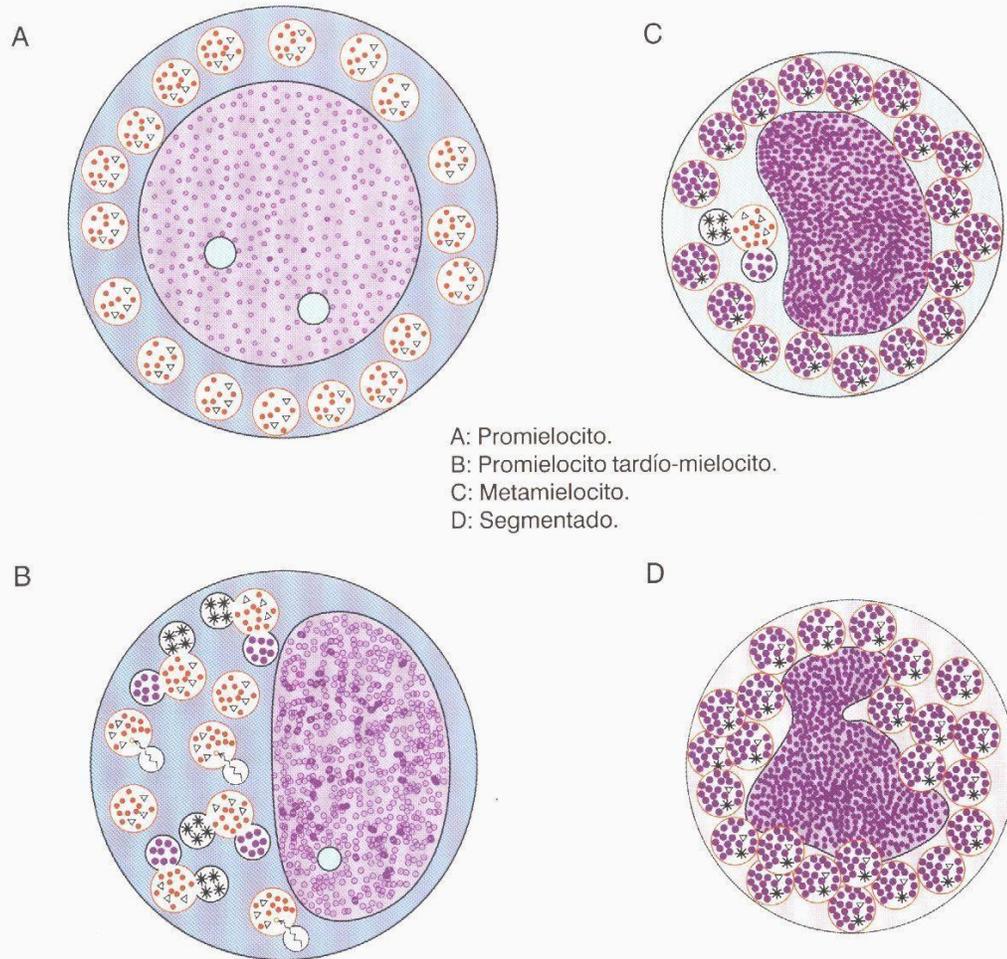


Figura 1. Esquema de maduración de los granulos de los basófilos.

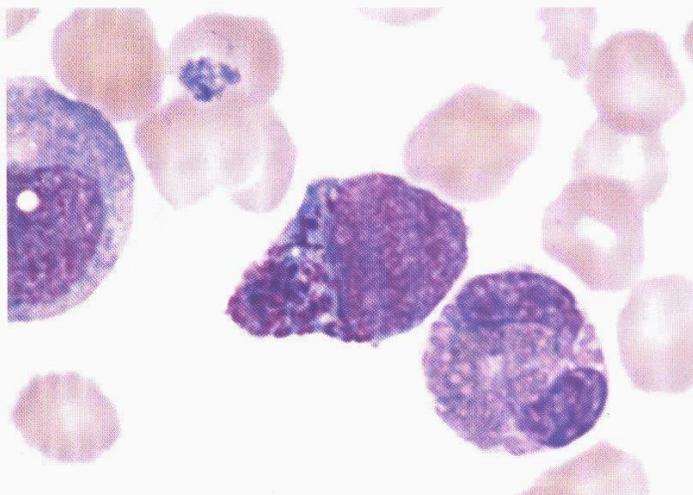


Figura 2. Promielocito-mielocito basófilo mostrando granulos azurófilos en su transformación a granulos basófilos (médula ósea normal).

Carrillo-Farga, Joaquín, Pérez-Vega, Sonia (1999). “Hematología para el Químico y el Patólogo Clínicos” XIII. Maduración de los Basófilos y las células cebadas. Laborat-acta 3. Archivos Mexicanos de Laboratorio.

## HEMATOPATOLOGÍAS

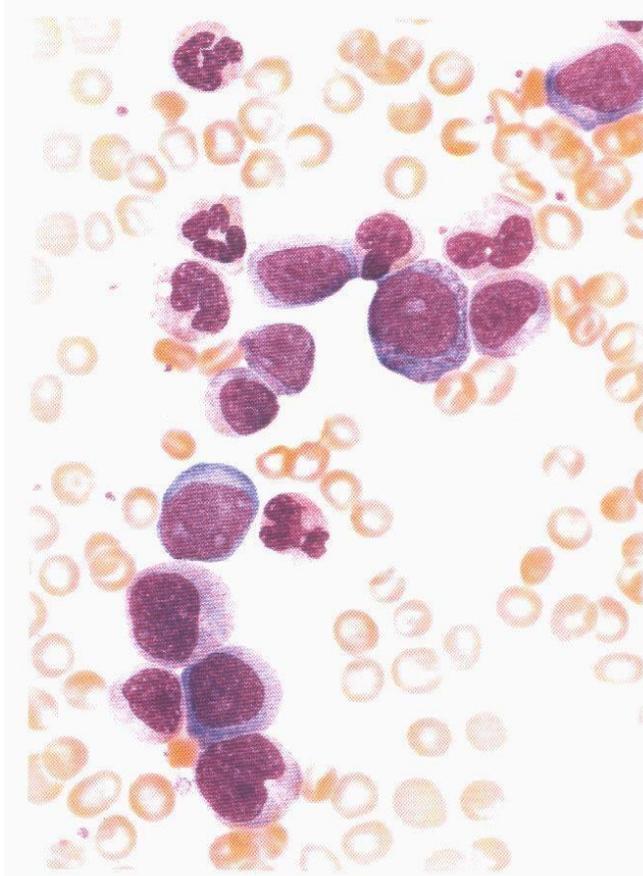


Figura 1. Leucemia granulocítica crónica.

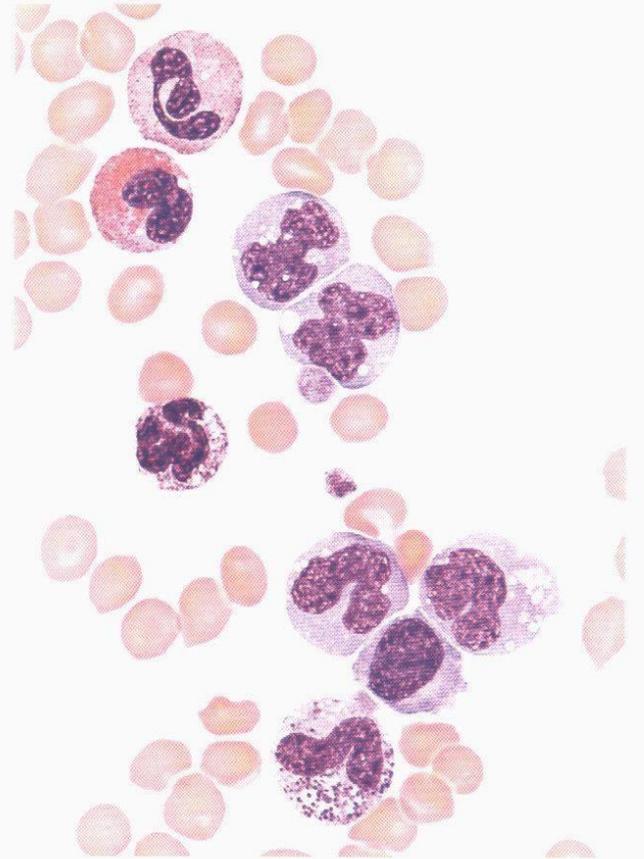
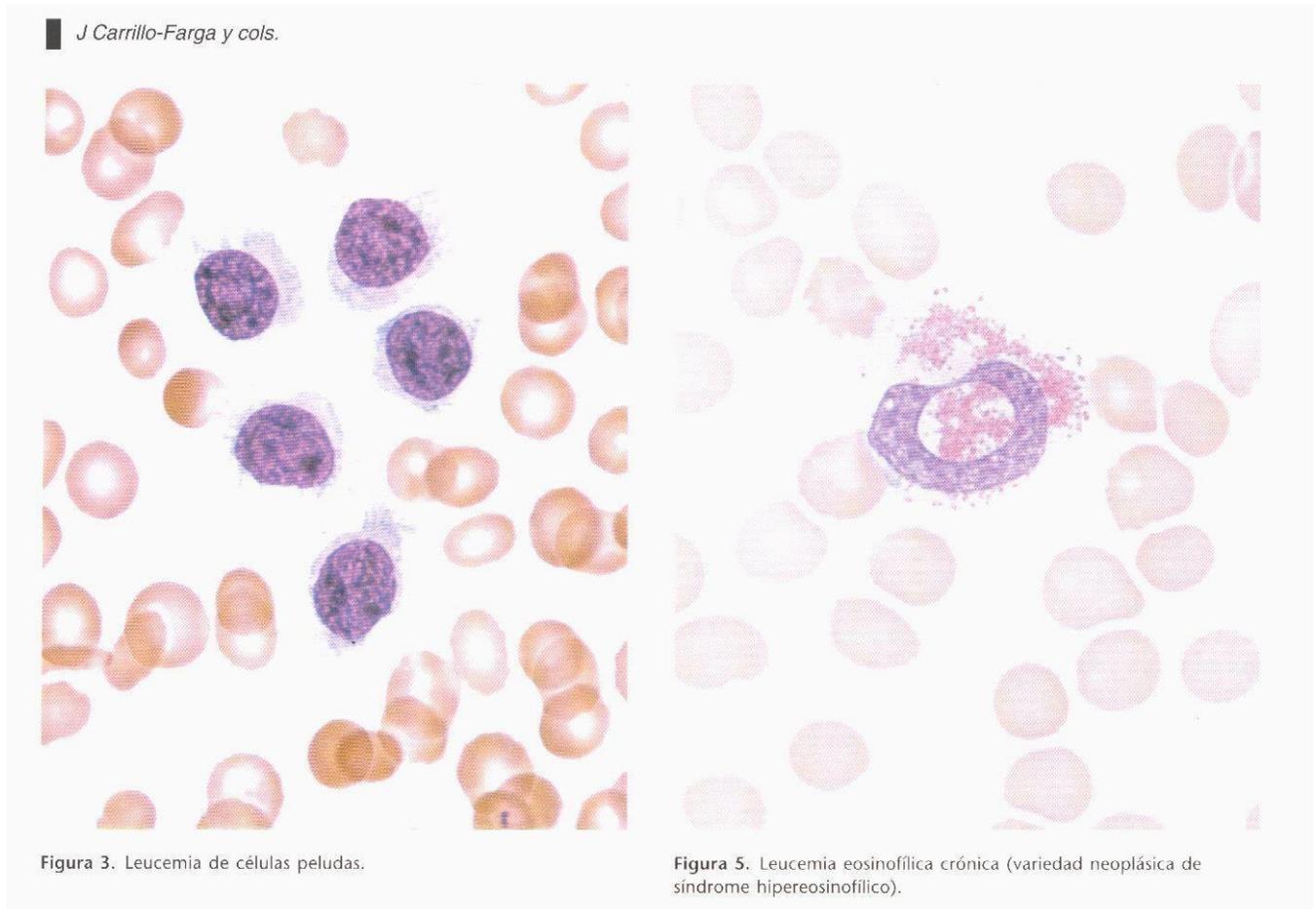
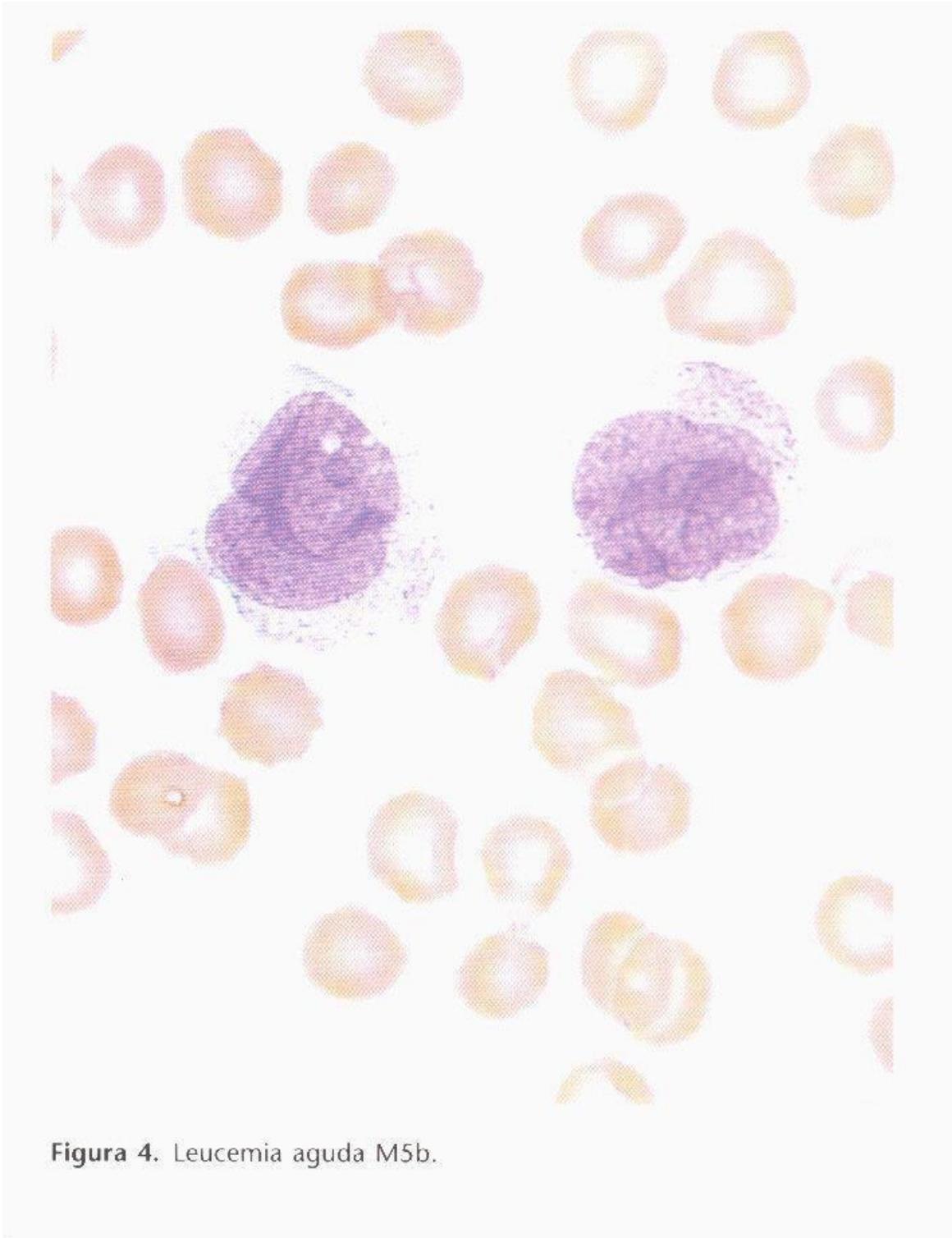


Figura 2. Leucemia mielomonocítica crónica, forma mieloproliferativa.

Carrillo-Farga, Joaquín, Pérez-Vega, Sonia (2000). **“Hematología para el Químico y el Patólogo Clínicos”**. **Galería de Neoplasias Hematopoyéticas**. Laborat-acta 4. Archivos Mexicanos de Laboratorio.



Carrillo-Farga, Joaquín, Pérez-Vega, Sonia (2000). **“Hematología para el Químico y el Patólogo Clínicos”**. **Galería de Neoplasias Hematopoyéticas**. Laborat-acta 4. Archivos Mexicanos de Laboratorio.



**Figura 4.** Leucemia aguda M5b.

Carrillo-Farga, Joaquín, Pérez-Vega, Sonia (2000). **“Hematología para el Químico y el Patólogo Clínicos”**. **Galería de Neoplasias Hematopoyéticas**. Laborat-acta 4. Archivos Mexicanos de Laboratorio.

FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA  
LABORATORIO DE HEMATOLOGÍA  
PRÁCTICA N0. 18  
“CITODIAGNÓSTICO DE EXUDADOS”  
**DURACION: 02 HR**

**OBJETIVO(S):**

Que el alumno conozca y practique la técnica para efectuar el citodiagnóstico de exudados, así como la interpretación de los resultados, ya que dicha prueba es sumamente útil para diferenciar procesos infecciosos agudos o crónicos de los procesos de tipo alérgico.

**FUNDAMENTO:**

Esta prueba se basa en la observación y diferenciación de las células hemáticas encontradas en muestras de exudados bronquiales o nasales, utilizando para este fin sus propiedades tintoriales con el colorante de Wright o Giemsa.

**GENERALIDADES:**

Los neutrófilos predominan en los procesos infecciosos agudos, especialmente los producidos por piógenos. También pueden encontrarse en las fases iniciales agudas de los exudados tuberculosos serosos. En los procesos crónicos dominan los linfocitos, especialmente en los de naturaleza tuberculosa. También predominan en algunas infecciones crónicas no tuberculosas, en los transudados crónicos y en los ocasionados por tumores. Los eosinófilos en gran cantidad y a veces como únicas células apreciables caracterizan típicamente el esputo de asma.

**EOSINOFILIA EN EXUDADO NASAL**

Eosinofilia en exudado nasal: Presencia del 10% o más de eosinófilos. Positiva en:

- ⊗ Rinitis alérgica
- ⊗ Rinitis intrínseca
- ⊗ De forma fisiológica en el 25-30% de lactantes (pero no en adultos).

Puede haber falsos negativos por:

- ⊗ Inadecuada recogida de la muestra.
- ⊗ Infección concomitante (los neutrófilos liberan un factor que inhibe la quimiotaxis y migración de los eosinófilos).
- ⊗ En tratamientos con esteroides sistémicos.

## **RINITIS INFECCIOSA:**

También denominada coriza o resfriado común es una infección aguda, generalmente afebril, que afecta principalmente a nariz y garganta aunque a menudo puede extenderse a laringe, tráquea y bronquios. Los causantes suelen ser en la gran mayoría, virus filtrables (rino y adenovirus, influenza y parainfluenza, sincitial respiratorio y ciertos ECHO y Coxsackie). Si bien las bacterias no suelen ser causantes, sí a menudo alguna de las patógenas que habitan normalmente en la nasofaringe, puede actuar como invasor secundario y dar lugar a complicaciones como otitis media y sinusitis.

### *Manifestaciones Clínicas*

El comienzo es típicamente abrupto, tras un período de incubación de 18 - 48 horas los síntomas son agudos cesando espontáneamente al cabo de 5 - 14 días. Suele comenzar con sensación de arañazo o dolor en la garganta, seguido de estornudos, hidrorrea (que al cabo de unos días suele transformarse en rinorrea espesa de aspecto purulento), obstrucción nasal y a veces ronquera y cefalea discreta. La fiebre es incomún, excepto en los lactantes y niños pequeños. Puede haber una tos seca aunque si ésta se hace intensa y productiva (mucopurulenta), sugiere una invasión bacteriana o micoplásmica primaria o secundaria.

En la rinoscopia se objetiva una mucosa marcadamente eritematosa y frecuentemente con secreciones purulentas.

El hemograma es normal, y la presencia de una leucocitosis indica una complicación bacteriana (o bien que se trata de otro proceso). En el frotis nasal se objetiva un aumentado número de polimorfonucleares y células epiteliales. Si por el contrario sólo se ven eosinófilos, debe pensarse en una rinitis alérgica o intrínseca. Si existen ambas (células inflamatorias y eosinofilia) sugiere que se trata de una rinitis alérgica o intrínseca complicada con la infección.

## **RINITIS ALERGICA:**

Es una enfermedad caracterizada por la presencia de síntomas nasales, debidos a una inflamación de la mucosa nasal, producida a su vez por una reacción alérgica local. A diferencia de la rinitis estacional los síntomas son recurrentes y casi continuos a lo largo de todo el año. Los alérgenos responsables más importantes son sustancias inhalantes procedentes de los ácaros del polvo doméstico, saliva, epitelios u orina de animales (gatos, perros, hamsters) y algunas especies de hongos atmosféricos.

Menos frecuentemente puede ser debido a alérgenos ocupacionales (Consultar Asma Ocupacional en la opción Enfermedades). Las infecciones respiratorias (que afectan con mayor frecuencia a estos pacientes) y los irritantes (humo del tabaco) tienden a agravar el cuadro. Algunos pacientes pueden, además, ser alérgicos a pólenes produciéndose entonces exacerbaciones estacionales de sus síntomas perennes.

### *Manifestaciones Clínicas*

La edad de comienzo suele ser en la infancia y en la juventud. Los síntomas son perennes, en general no muy severos debidos a una exposición a un alergeno ambiental en concentraciones bajas pero constante. La obstrucción nasal puede ser el único síntoma o el síntoma predominante. También puede haber estornudos en salvas, prurito nasal ocular y ótico, hidrorrea y goteo postnasal que puede dar lugar a un continuo carraspeo y tos crónica. Pueden presentarse también, aunque con menor frecuencia, cefaleas frontales, sinusitis, hipoacusia, otitis media trasudativa, anosmia, ageusia y epistáxis recurrentes.

En el examen físico puede encontrarse un ensanchamiento de la sección media de la nariz, una mucosa nasal edematosa y pálida con secreción acuosa y raramente pólipos. Un pliegue nasal transversal (patognomónico) debido al saludo alérgico (frotarse la nariz hacia arriba para aliviar el prurito). Círculos oscuros bajo los ojos ojeras alérgicas. Hipertrofia de los folículos linfoides de la pared faríngea posterior. La respiración bucal produce sequedad de lengua y garganta y cuando es persistente, puede dar lugar en niños afectados desde muy jóvenes, paladar ojival y mal oclusión dental.

Clínicamente se observa una buena respuesta al CGDS y/o esteroides. Es frecuente la presencia de antecedentes familiares y/o personales de atopía.

### *Diagnóstico*

Las pruebas cutáneas positivas concordantes con la historia clínica nos dan el diagnóstico. Si no se pueden realizar pruebas cutáneas puede utilizarse RAST o ELISA-CAP, para detectar IgE sérica específicas contra el o los alergenos sospechosos. Una eosinofilia superior al 10% en el frotis nasal apoya el diagnóstico. Puede haber un engrosamiento de la mucosa maxilar aunque en general las alteraciones radiológicas son ligeras. En casos dudosos se puede corroborar el diagnóstico mediante la realización de provocaciones nasales con el o los antígenos incriminados.

### **ASMA EXTRINSECA ESTACIONAL:**

También denominado asma polínico, es un tipo de asma (enfermedad pulmonar obstructiva reversible) producido por una reacción de hipersensibilidad de tipo inmediato a diferentes alergenos (antígenos que causan reacciones alérgicas), que se encuentran dentro de algunas especies de pólenes. Para que el paciente presente síntomas es necesario que las especies de pólenes a las cuales está sensibilizado, se encuentren en su medio ambiente (en la atmósfera) en suficiente concentración, lo cual sólo se produce durante la floración de las plantas que lo producen).

## Manifestaciones Clínicas

Suele afectar preferentemente a niños y jóvenes adultos, aunque puede afectar a cualquier edad. Los síntomas son estacionales produciéndose sólo durante la época de polinización de aquellos pólenes a los cuales está sensibilizado, permaneciendo asintomáticos el resto del año. Estos consisten en episodios recortados de disnea, sibilancias, opresión torácica y tos que ceden de forma espontánea o bien bajo la acción del tratamiento. Es frecuente que el paciente presente prurito naso-ocular así como otros síntomas de fiebre del heno, que en muchos casos preceden al asma en una o más estaciones. Durante este período los pacientes empeoran con las salidas al campo, siendo frecuentes (como en los demás tipos de asma) las exacerbaciones nocturnas.

Las tormentas y/o chaparrones de primavera-verano se asocian con días epidémicos de asma en estos pacientes, por el contrario la lluvia mantenida durante 2 o más días son beneficiosas (barrido de pólenes atmosféricos). Los alérgicos a las gramíneas llegan a estar asintomáticos en la playa (donde la incidencia de pólenes es baja).

Es común que tengan una historia personal y/o familiar de atopia (enfermedades alérgicas como dermatitis atópica, rinitis alérgica, etc.). Los hallazgos físicos no difieren de los de otros tipos de asma. Si tiene rinitis asociada presentará sus signos característicos.

## *Diagnóstico*

Una historia compatible junto con unas pruebas cutáneas positivas a pólenes aerovagantes en su lugar de residencia suele ser suficiente para obtener el diagnóstico. Mediante RAST o ELISA se puede detectar IgE sérica específica contra los pólenes responsables. La IgE sérica total suele estar elevada. Es común una eosinofilia tanto en esputo como periférica. Si en el momento de la exploración el paciente está sintomático puede confirmarse el broncoespasmo mediante un test de broncodilatadores. La radiología de tórax es en general normal o bien puede presentar una hiperinsuflación.

Su carácter recidivante estacional permite fácilmente diferenciarlo de los demás tipos de asma y de la bronquitis aguda.

En casos dudosos puede confirmarse el diagnóstico mediante la realización de provocaciones inhalativas bronquiales con los antígenos (pólenes) incriminados (sólo por personal entrenado y con medios de reanimación disponibles).

## **ASPERGILOSIS PULMONAR ALERGICA:**

La aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA) es una enfermedad caracterizada por obstrucción reversible de las vías respiratorias (es decir, asma), infiltrados pulmonares transitorios, eosinofilia y fiebre, causados por la respuesta de hipersensibilidad contra los antígenos de *Aspergillus fumigatus* (Af), que se encuentran presentes en el árbol bronquial. En el huésped atópico, la colonización por Af (no la invasión hística real) de las vías

respiratorias, constituye una poderosa fuente de antígenos híficos que inducen una hipersensibilidad mediada por IgE.

Al ponerse en contacto los antígenos de los Af con la IgE específica presente en los mastocitos pulmonares, se produce una liberación de mediadores que dan lugar a los síntomas broncospásticos de la enfermedad. Además, éstos también facilitan la absorción de los antígenos aspergílares. Una vez absorbidos, éstos reaccionan con anticuerpos precipitantes IgG, que también deben estar presentes para que se produzca la enfermedad.

La reacción antígeno-IgG da lugar a una reacción inflamatoria peribronquial, responsable de las lesiones destructivas observadas en estos pacientes (bronquiectasias, fibrosis y retracción pulmonar). En Inglaterra se estima que afecta al 20% de la población asmática ingresada en los hospitales por afección torácica crónica. En España son pocos los casos publicados, apareciendo como una entidad infrecuente (o poco reconocida).

### *Manifestaciones Clínicas*

La ABPA es un trastorno episódico recurrente que posee una amplia gama de presentaciones clínicas que dependen de la gravedad de la afección. Entre las manifestaciones más típicas se incluyen el asma (tos, opresión torácica, disnea y sibilancias), niveles elevados de IgE, eosinofilia, infiltrados pulmonares transitorios que cursan con fiebre moderada y la expectoración con la tos de taponos de esputo marrones. Los casos leves pueden confundirse con asma extrínseca mientras que los crónicos pueden presentar síntomas más compatibles con bronquiectasias y afectación pulmonar irreversible. En general se suele diagnosticar en jóvenes adultos (< 35 años), no infrecuentemente con antecedentes de atopia (rinitis, eccema, sensibilización a alimentos, inhalantes).

Los pacientes pueden presentar 5 estadios:

Estadio I (agudo) en el que presenta asma, respuesta cutánea inmediata al Af, precipitinas contra el Af, aumento de la IgE sérica total, eosinofilia periférica, infiltrados radiológicos y bronquiectasias proximales.

Estadio II (remisión) bajo tratamiento con prednisona se consigue aclaramiento de la radiología y descenso de la IgE durante al menos 6 meses. Ocasionalmente las remisiones pueden durar varios años.

Estadio III (exacerbación) el paciente desarrolla de nuevo infiltrados radiológicos, elevación de la IgE y asma sintomático.

Estadio IV (corticodependencia). En este estadio el paciente ya no puede prescindir de la prednisona pues si se elimina la medicación recidiva el asma severa y los infiltrados. Además, a pesar de los corticoides la IgE total permanece elevada, así como las precipitinas e IgE específica contra Af.

Estadio V (fibrótico). El paciente ya presenta cambios fibróticos extensos y un grado de obstrucción irreversible al flujo aéreo en las pruebas de función pulmonar. La muerte sobreviene por fallo respiratorio y por fallas pulmonares.

No todos los pacientes evolucionan a estos últimos estadios si son diagnosticados y tratados antes de que se hayan producido cambios fibróticos. El diagnóstico diferencial debe hacerse con el asma extrínseco, neumonías, tuberculosis pulmonar, carcinoma y neumonitis por hipersensibilidad.

### *Diagnóstico*

Para realizar el diagnóstico de ABPA es necesario que el paciente presente al menos los primeros 6 signos primarios descritos a continuación:

#### Primarios:

- ⊗ Obstrucción bronquial episódica (asma)
- ⊗ Eosinofilia en sangre periférica
- ⊗ Reactividad cutánea inmediata frente a los antígenos de Af
- ⊗ Precipitinas contra los antígenos de Af
- ⊗ Aumento de la IgE sérica total
- ⊗ Antecedentes de infiltrados (que suelen ser bilaterales y en LS)
- ⊗ Bronquiectasias proximales (centrales)

#### Secundarios:

- ⊗ Af en esputo
- ⊗ Antecedentes de expectoración de tapones mucosos
- ⊗ Reactividad cutánea tardía frente a los antígenos de Af

Son consideradas por algunos autores como patognomónicas de ABPA; en niños y adultos sospechosos, debe hacerse de forma inicial una Rx de tórax y una tomografía; si es negativa éstas se deben repetir al año. Como procedimientos especiales puede utilizarse la broncoscopia, y por último, la broncografía para determinar con más eficacia la presencia de bronquiectasias.

#### EQUIPO:

Microscopio  
Centrífuga

#### MATERIAL:

- a) Biológico: Exudado nasal o bronquial
- b) De laboratorio: Hisopos estériles  
Portaobjetos  
Puentes de tinción  
Colorante de Wright  
Solución amortiguadora de fosfatos

### Solución de citrato de sodio al 3.8%

#### TÉCNICA:

1. Centrifugar una muestra reciente del exudado (nasal o bronquial). Para evitar la coagulación se recoge el líquido mezclándolo con un poco de solución de citrato de sodio al 3.8%, aunque es preferible hacer el citodiagnóstico prescindiendo del anticoagulante.
2. Verter el líquido que sobrenada y hacer extensiones delgadas del sedimento del portaobjetos. Es esencial que el sedimento esté bien centrifugado con el objeto de conseguir suficiente número de células en las extensiones. Si hay escasa secreción y no es posible centrifugar se hacen las extensiones tomando directamente el exudado con un hisopo estéril.
3. Secar la preparación al aire.
4. Teñir con el colorante de Wright o Giemsa y secar la preparación al aire.
5. Observar con objetivo de inmersión; contar y clasificar 100 células. Pueden encontrarse células de 4 clases: linfocitos, neutrófilos, eosinófilos y células endoteliales; también suelen encontrarse en las extensiones, hematíes en número variable.

#### INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:

- A. NEUTRÓFILOS: Predominan en los procesos infecciosos agudos, especialmente los producidos por piógenos. También pueden encontrarse en las fases iniciales agudas de los exudados serosos.
- B. LINFOCITOS: Predominan en los procesos crónicos, especialmente de naturaleza tuberculosa. También se encuentran en algunas pleuresías crónicas no tuberculosas, en los transudados crónicos y en los ocasionados por tumores.
- C. EOSINÓFILOS: En gran cantidad y a veces como únicas células apreciables caracterizan típicamente el esputo del asma, pero también pueden aparecer en otras afecciones alérgicas como catarro eosinófilo, bronquitis alérgica, etc, así como también en infecciones serosas causadas por Neumococos.
- D. Suelen encontrarse Células Endoteliales en gran cantidad junto a linfocitos y hematíes, procediendo de las grandes cavidades serosas. Estas células pueden encontrarse aisladas o bien formando masas.
- E. Los eritrocitos aparecen íntegros reconocibles como tales en la hemoptitis recientes sobre todo si son altas. Los esputos hemoptíticos en los procesos crónicos y de situación profunda (gangrena y cáncer), presenta a menudo los hematíes lisados y con hemoglobina libre.

FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA  
 LABORATORIO DE HEMATOLOGÍA  
 PRÁCTICA N0. 19  
 “TINCIÓN DEL SUDÁN NEGRO B”  
**DURACION: 02 HR**

**OBJETIVO(S):**

Que el alumno aprenda a identificar la reacción tanto positiva como negativa de las células sanguíneas a la tinción de Sudán Negro B, así como la utilidad en el diagnóstico de enfermedades hematológicas.

**FUNDAMENTO:**

El Sudán Negro B es un colorante de la serie diazoica que tiñe diversos lípidos, incluyendo grasas neutras y en particular fosfolípidos. Los vapores de formaldehído (fijador) fijan las grasas y fosfolípidos, los que al contactar con el colorante toman un color negro-azul que contrasta con el colorante de Wright usado en la contratinción.

**GENERALIDADES:**

El sudán negro B es un colorante diazo que tiñe fosfolípidos, grasas neutras y esteroides. La tinción se produce porque el colorante sudán negro B es más soluble en los lípidos intracelulares que en el alcohol solvente de la tinción. Los componentes celulares que contienen lípidos se tiñen de color negro pardo con el colorante sudan negro B, el cual tiñe gránulos primarios y secundarios de la línea celular granulocítica. Los bastones de Auer tienen una membrana fosfolípida abundante que se muestra con la tinción Sudan negro B. Los neutrófilos, los precursores de los neutrófilos y los eosinófilos muestran granulación intracelular de color azul negro. Los monocitos se tiñen con menor intensidad que los neutrófilos, los linfocitos no se tiñen con sudan negro B. La tinción con este colorante es paralela a los resultados que se observan con la tinción de mieloperoxidasa, por lo cual es útil en la diferenciación entre las leucemias mieloblásticas agudas y las leucemias linfoblásticas agudas.

<b>Tinción</b>	<b>Tipo muestra</b>	<b>de Componentes celulares teñidos</b>	<b>Especificidad celular</b>	<b>interpretación</b>
Sudán negroB	Frotis, impresiones cortes congelación	Gránulos o primarios secundarios; bastones de Auer	Neutrofilos y precursores-positividad fuerte	Es paralela a la tinción de mieloperoxida.

Las tinciones para grasas suelen ser positivas con las técnicas de Sudán negro B, Sudán IV, Sudán III y Oil Red O, se describe positividad en las vacuolas citoplasmáticas. Este material es relativamente insoluble y la tinción resiste en tratamiento posterior de extracción con acetona, alcohol-cloroformo y piridina.

Las gotas lipídicas demostradas con el Sudán negro B han sido interpretadas como mitocondrias, observándose positividad del citoplasma de las células granulares para las

tinciones de mitocondrias (técnica de Altmann de ácido fucsínico-ácido pícrico y método adaptado de tinción en bloque de Swank-Davenport para las fibras mielínicas degeneradas).

## **ENFERMEDAD DE MASTOCITOS**

**DEFINICIÓN:** Enfermedad rara caracterizada por una proliferación anormal de mastocitos. Más frecuentemente limitada a la piel (mastocitosis cutánea), 10-20% mastocitosis sistémica con afectación de médula ósea, bazo, ganglios linfáticos, hígado o otros órganos con o sin afectación cutánea.

**MORFOLOGÍA:** Mastocitos atípicos con citoplasma abundante, gránulos escasos o invisibles y núcleo lobulado o plegado. Acompañado de fibrosis y eosinofilia. En la piel se disponen como infiltrados dérmicos perivasculares. En la médula ósea se disponen en agregados paratrabeculares o perivasculares acompañados de fibrosis que puede ser intensa y dar lugar a aspirados pobres. La leucemia es rara. El 30-40% de los casos se asocia a otra neoplasia hematológica coexistente (sd. mieloproliferativos, sd. mielodisplásicos, leucemia aguda y linfomas).

**INMUNOFENOTIPO Y CITOQUÍMICA:** Gránulos metacromáticos con azul de toluidina y Giemsa; positivos con esterasa cloroacetato naftol-ASD y Sudán negro. CD45 +, CD33 +, CD68 +, Vimentina +, Alfa-1-antitripsina y Alfa-1-antiquimotripsina +.

**HALLAZGOS CLÍNICOS:** Prurito, urticaria, dolor abdominal, diarrea, hipertensión y anafilaxia. En la enfermedad sistémica hay esplenomegalia, linfadenopatía o dolor óseo. La mastocitosis cutánea ocurre en niños y una pequeña proporción se convierten en sistémica de curso indolente. Algunos pacientes, generalmente adultos desarrollan enfermedad sistémica sin lesiones cutáneas, de curso agresivo con supervivencia de 2-4 años. La leucemia de mastocitos es muy agresiva.

Clasificación, basada en la distribución y morfología de las lesiones:

Enfermedad de mastocitos no sistémica

- Mastocitoma cutáneo localizado
- Mastocitosis cutánea (urticaria pigmentosa)
- Mastocitosis primaria de la médula ósea
- Sarcoma maligno de mastocitos
- Enfermedad sistémica de mastocitos

- Indolente (benigna) con lesiones cutáneas
- Agresiva (maligna)

- Sin lesiones cutáneas
- Asociada a otras enfermedades hematológicas
- Leucemia de mastocitos

**LEUCEMIA MIELOBLASTICA AGUDA:**

Hay que decir primero que se trata de un grupo más heterogéneo de enfermedad, que afecta a gente más adulta (entre 15 y 39 años), hay bastantes subtipos que no se considerarán. El 60% a 80% de los pacientes alcanza remisión con quimioterapia intensiva pero recae dentro de 12 a 18 meses. Largos periodos libres de enfermedad solamente se presentan en un 10% a un 15% de los pacientes, entonces queda claro que el pronóstico general es más malo que la leucemia linfoblástica aguda.

La leucemia mieloblástica aguda (LMA) representa sólo de 15 a 20% de las leucemias en los niños. Parece haber un aumento notable de incidencia en la LMA en adultos después de los 50 años de edad. Éste también es el tipo de leucemia que se ve con mayor frecuencia cuando los síndromes mielodisplásicos se transforman en leucemia.

La leucemia es un trastorno clonal, lo cual significa que las células leucemicas se originan a partir de una célula progenitora mutante única. La célula mutante retiene la capacidad de proliferar, pero ha perdido la de diferenciarse y madurar. La enfermedad se origina de tejido hematopoyetico de la médula ósea, pero con la progresión pueden encontrarse células malignas que infiltran múltiples órganos. En algunos pacientes con LMA se encuentran anormalidades citogeneticas similares en todos los descendientes de la célula progenitora mieloides, incluso eritrocitos, granulocitos, monocitos y megacariocitos. En otros pacientes, la anormalidad citogenética sólo puede estar presente en granulocitos, lo cual sugiere que la célula neoplásica blanco es una célula progenitora precursora más madura, quizá la UFC-GM.

Los signos y síntomas de presentación de la enfermedad se relacionan con la supresión de la hematopoyesis normal. En casi todos los pacientes se encuentra palidez, fatiga y debilidad por la anemia. La presencia de hemorragias, equimosis y hemorragias petequiales causadas por trombocitopenia también son manifestaciones constantes de la enfermedad. Es posible que la infección que no responde a la terapéutica apropiada sea el primer signo de leucemia. La infección suele ser menor, pero en ocasiones puede ser más grave (neumonía, meningitis). Cuando hay fiebre presente ésta suele vincularse con una infección subyacente. El dolor de los huesos en el examen físico con aproximadamente dos terceras partes de los pacientes. Al momento del diagnostico, en cerca de 50% de los pacientes hay esplenomegalia, hepatomegalia y linfadenoparí. Los hallazgos clínicos del subgrupo M3, leucemia promielocitica aguda, difieren de otros tipos de LMA. La presencia de un trastorno de la coagulación que pone en peligro la vida es un signo común de presentación. Los pacientes son más jóvenes, se tienen cifras de leucocitos menores y la organomegalia no es común.

## HALLAZGOS DE LABORATORIO CARACTERISTICOS DE LA LMA

### **SANGRE PERIFERICA**

Anemia normocrómica normocítica

Eritrocitos nucleados

Anisocitos y poikilocitosis variable

Plaquetas generalmente disminuidas: formas hipogranulares y gigantes presentes

Cifra de leucocitos ordinariamente aumentada, pero puede ser normal o disminuida

Blastos (15-95%), puede haber bastones de Auer presentes

Monocitos

Neutropenia

Neutrófilos displásicos

Eosinofilia y basofilia variable

### **MÉDULA ÓSEA**

Hipercelular

Displásica

> 30% blastos

Otros hallazgos de laboratorio pueden reflejar proliferación y el recambio celular crecientes. La hiperuricemia y un aumento en la deshidrogenasa láctica son hallazgos comunes causados por el aumento en el recambio celular. Se cree que la hipercalcemia, cuando está presente, es causada por aumento de la reabsorción ósea vinculada con la proliferación leucémica en la médula ósea. El aumento de la muramidasa en el suero y en la orina es un hallazgo clásico en las leucemias con un componentes monocítico.

Desde 1976, la asignación a alguno de los principales grupos de leucemia y a subgrupos dentro de cada grupo principal, se ha basado en características morfológicas y citoquímicas establecidas por el sistema clasificación FAB. En el último decenio, también se ha usado la inmunofenotipificación de células leucémicas y el análisis citogenético de aberraciones cromosómicas para complementar los datos morfológicos y citoquímicos. En la actualidad es ampliamente aceptado que el mejor procedimiento para clasificar a la leucemia aguda usa una combinación de criterios morfológicos, citoquímico, inmunológico y citogenético.

La clasificación inicial de las anemias agudas requiere la distinción entre la LMA y la LLA. La tinción citoquímica con peroxidasa es el parámetro usado más ampliamente para hacer esta diferenciación. En la LMA, cuando menos 3% de los blastos es positivo a peroxidasa o **Sudán negro B** o a ambos, mientras que en la LLA los blastos son negativos. El hallazgo de bastones de Auer o gránulos en los blastos en frotis teñidos con Romanowsky también ayuda a identificar blastos de línea celular mieloide. Las tinciones citoquímicas comunes, sin ser positivas, aportan sólo evidencia negativa para la LLA. Sin ser pruebas adicionales cuando los blastos son negativos con mieloperoxidasa y sudán negro B.

#### EQUIPO:

Microscopio

#### MATERIAL:

- a) Biológico: Sangre obtenida con EDTA
- b) De laboratorio: Portaobjetos
  - Puente de tinción
  - Cámara de fijación
  - Recipiente de Coplin
  - Formaldehído al 37%
  - Solución de Sudán Negro B
  - Solución Tamponada
  - Solución colorante
  - Etanol al 70%
  - Colorante de Wright
  - Solución buffer de fosfatos para tinción de Wright

#### TÉCNICA:

1. Hacer un frotis sanguíneo en la forma acostumbrada.
2. Fijar en vapores de formaldehído en la cámara de fijación durante 10 minutos.  
Lavar y secar al aire.
3. Teñir durante 60 minutos con la solución colorante.
4. Lavar con etanol al 70% durante 2 ó 3 minutos. Lavar y secar al aire.
5. Contrateñir con colorante de Wright.
6. Observar con objetivo de inmersión, clasificando 100 células como Sudán Negro B positivas o negativas. Las células Sudán Negro B positivas presentan una coloración negra en su citoplasma.

#### INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:

En la sangre normal, los granulocitos se tiñen con el Sudán Negro B; los monocitos se tiñen débilmente o no se tiñen, en cambio los linfocitos siempre son negativos a esta tinción.

Esta reacción es de gran utilidad y especificidad en la identificación de LAM (Leucemia Mieloblástica Aguda), ya que en forma típica los elementos granulocíticos, desde mieloblastos (incluyendo Cuerpos de Auer) hasta polisegmentados (incluso basófilos y eosinófilos), presentan granulación gruesa de color negro en su citoplasma.

FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA  
LABORATORIO DE HEMATOLOGÍA  
PRÁCTICA N.º 20  
“RECuento DE PLAQUETAS”  
**DURACION: 01 HR**

**OBJETIVO(S):**

Que el alumno aprenda a realizar el recuento de plaquetas por el método manual con suficiente precisión y exactitud, así como la interpretación de los resultados obtenidos y sus correlaciones con estados patológicos.

**FUNDAMENTO:**

El recuento de plaquetas consiste en conocer el número de estos elementos que se encuentran en un microlitro (milímetro cúbico) de sangre. Para esto es necesario hacer una dilución de la sangre utilizando una pipeta de Thoma para glóbulos blancos y un líquido diluyente especial que hace visibles a las plaquetas a la vez que destruye a los eritrocitos. Posteriormente se examinará al microscopio un volumen conocido de la muestra en la Cámara de Neubauer, contando el número de plaquetas en la retícula y mediante un cálculo se obtiene el número de elementos por  $\text{mm}^3$ .

**GENERALIDADES:**

Las plaquetas circulan como un disco citoplasmático sin núcleo con un diámetro promedio de  $4 \mu\text{m}$  y un volumen de 10 fl. La distribución del tamaño de las plaquetas es muy amplia comparada con otras células sanguíneas. La forma discoide se mantiene en el estado de no estimulación debido a un citoesqueleto circundante de microtubulos. Los receptores de glucoproteínas de la membrana regulan las reacciones de contacto de superficie como adhesividad, cambio de forma, adhesión, contracción interna y aglutinación. La activación por contacto de las membranas de los fosfolípidos también genera actividad procoagulante y ácido araquidónico. La superficie de la membrana es continua y con un sistema membranoso canalicular abierto de tipo esponja, y se interdigital con un sistema tubular denso que no está conectado con la superficie. Los canales de los sistemas canalicular abierto y tubular denso en las plaquetas forman complejos membranosos entretejidos, idénticos en su morfología, al conjunto de tubulos transversos y sarcotubulos en las células musculares embrionarias.

Las plaquetas son esenciales para la hemostasia normal y para desarrollar cuatro distintas funciones en respuesta al daño vascular: 1) mantenimiento continuo de la integridad vascular al sellar las deficiencias menores del endotelio; 2) detección inicial de la hemorragia a través de la formación de tapones plaquetarios; 3) estabilización del tapón hemostático al contribuir con la actividad procoagulante haciendo que la cascada de coagulación forme fibrina y 4) promoción de la curación vascular al estimular la migración de células endoteliales y la migración y proliferación de células musculares lisas mediales.

Las plaquetas se pueden contar por métodos manuales o automatizados. Los métodos manuales se practican al diluir una muestra de sangre entera y contar las plaquetas en una alícuota para calcular el número por litro. Los procedimientos descritos comunmente son los métodos de Rees y Ecker, y de Brecker-cronkite. El método de Rees y Ecker emplea un

líquido diluyente que contiene azul de cresil brillante. La tinción ayuda a hacer más visibles las plaquetas. El conteo se realiza con el uso de un microscopio de luz. Para un conteo preciso se sugiere un microscopio de fase y un hemacitómetro plano especial. También puede usarse un microscopio de luz y un hemacitómetro sencillo. Se dispone de instrumentos automatizados y semiautomatizados confiables para el conteo de las plaquetas y su uso se prefiere sobre los métodos manuales debido a que son más precisos y se pueden controlar con facilidad. Algunos instrumentos usan sangre entera anticoagulada y otros requieren centrifugación de la sangre para obtener plasma rico en plaquetas. Ya sea que se usen métodos manuales o automatizados, es necesario correlacionar el conteo con la concentración de plaquetas en un frotis de sangre periférica bien preparado. Normalmente se ven de 8 a 20 plaquetas por campo a un aumento de 1000 x.

El número de plaquetas se puede estimar al multiplicar el número promedio encontrado en 5 a 10 campos por 20 000, si el frotis se hizo con la sangre capilar, debe usarse un factor de 15 000 si la sangre estaba anticoagulada. La morfología de las plaquetas también se debe observar y tomarse nota de la presencia de formas grandes granulosas y otras plaquetas anormales.

Los trastornos de las plaquetas pueden causar la formación defectuosa del tapón hemostático y hemorragia debido a la reducción del número de plaquetas (trombocitopenia) o a la alteración de su función a pesar de existir cifras normales de plaquetas (disfunción plaquetaria).

## TROMBOCITOPENIA

Cantidad de plaquetas inferior al intervalo normal de 140.000-440.000/mm<sup>3</sup>

El fracaso en la producción de plaquetas, el secuestro esplénico de éstas, el aumento de su destrucción o utilización, así como su dilución pueden originar trombocitopenia. Independientemente de la causa, la trombocitopenia grave provoca un patrón hemorrágico característico: múltiples petequias cutáneas, a menudo más evidentes sobre la parte inferior de las piernas, pequeñas equimosis diseminadas en zonas expuestas a traumatismos menores, hemorragias mucosas (epistaxis, hemorragias de los tractos GI, GU y vaginal) y hemorragias excesivas tras intervenciones quirúrgicas. La hemorragia GI intensa y las hemorragias en el SNC pueden ser situaciones con riesgo vital. No obstante, la trombocitopenia no produce hemorragias masivas en los tejidos (p. ej., hematomas viscerales profundos o hemartrosis), lo cual es característico de las hemorragias secundarias a trastornos de la coagulación.

La trombocitopenia puede ser primaria (idiopática) o secundaria a una gran variedad de trastornos. Pueden distinguirse dos grupos generales a saber; aquellos en los cuales los megacariocitos en la médula ósea están disminuidos con producción disminuida de plaquetas y aquellos en los que hay cantidades normales o aumentadas de megariocitos, lo que indica una producción normal o aumentada de plaquetas pero con destrucción periférica aumentada o dilución de las mismas.

La trombocitopenia con producción disminuida de plaquetas puede ser parte de una depresión general de la médula ósea o presentarse por sí misma. Se encuentra en enfermedades difusas de la médula ósea, como leucemias, linfomas, mieloma, carcinomatosis secundaria, envenenamiento por sustancias químicas o medicamentos y como consecuencia de radiación ionizante. Personas alcohólicas a menudo se encuentran moderada o intensamente trombocitopénicas después de una borrachera. La abstinencia de alcohol da lugar a recuperación rápida de la cuenta de plaquetas a lo normal. En algunos voluntarios sanos se ha producido trombocitopenia administrándoles alcohol.

La trombocitopenia con producción aumentada de plaquetas esta se observa cuando hay destrucción o dilución excesiva de las plaquetas en la circulación. Es común la hiperplasia megacariocítica. En pacientes que reciben transfusión masiva por haber sufrido hemorragia abundante o quienes reciben exsanguinotransfusión, la trombocitopenia, por lo general, se debe a dilución, especialmente si la sangre del donador no es fresca. La destrucción de plaquetas puede ser debida a factores inmunitarios o de otra naturaleza. Los estados o situaciones que producen este tipo de trombocitopenia incluyen transfusiones, sensibilidad a medicamentos y toxinas, coagulación intravascular diseminada, diversas infecciones, trombocitopenia neonatal, lupus eritematoso generalizado e hiperesplenismo. También puede asociarse a anemia hemolítica o a neutropenia. En muchos pacientes no hay causa evidente y este grupo de enfermos se dice que tienen púrpura trombocitopénica idiopática.

En casos de sensibilidad, el medicamento, por lo general, apronal, quinina, quinidina, digitoxina o un barbiturico, hace las veces de un hapteno e induce la producción de un anticuerpo contra el complejo plaqueta-medicamento. El trastorno desaparece cuando se suspende el medicamento. La sensibilidad al fármaco se puede demostrar mediante la prueba del “parche”; en personas sensibles, el parche provoca púrpura cutánea, la cual puede ser debida a sensibilidad del capilar que comparte un antígeno común con las plaquetas. Esta prueba debe llevarse a cabo sólo después de tomarse las precauciones debidas en virtud de que puede precipitar una trombocitopenia más intensa.

En una gran variedad de infecciones puede ocurrir trombocitopenia durante las etapas agudas o de convalecencia. Entre las más comunes figuran las vírales e incluyen infecciones respiratorias, sarampión, mononucleosis infecciosa, varicela, parotiditis y hepatitis. Cada vez se reconoce con más frecuencia el consumo de plaquetas que produce trombocitopenia en la coagulación intravascular diseminada asociada a infecciones graves.

En la trombocitopenia neonatal, la trombocitopenia del recién nacido es debida a los anticuerpos maternos que se encuentran en la circulación del lactante. Cede en forma espontánea conforme el anticuerpo desaparece con el tiempo.

Las plaquetas a menudo se hallan deprimidas en trastornos del metabolismo del ácido fólico y la cobalamina; por ejemplo, la anemia perniciosa a veces se manifiesta por síntomas hemorrágicos debidos a trombocitopenia. Los venenos de insectos y víboras también pueden causar trombocitopenia. La uremia puede asociarse con función plaquetaria defectuosa y en algunos casos aparece trombocitopenia. Hay algunas pruebas de que ocurre disfunción plaquetaria en la enfermedad de von Willebrand debido a deficiencia de un cofactor plasmático necesario que se ha llamado cofactor de von Willebrand.

El paciente con trombocitopenia suele sufrir equimosis y sangrado debidos a defecto plaquetario o síntomas originados por un trastorno subyacente. A veces el trastorno puede diagnosticarse en forma incidental, con exámenes de laboratorio, sin que produzca síntomas o signos. Puede producirse trombocitopenia en forma insidiosa o aguda; en general aparece equimosis y sangrado si la concentración plaquetaria es menor de  $50 \times 10^9/\text{lt}$  de sangre, pero si no hay una correlación exacta entre la concentración de plaquetas y la hemorragia. El sangrado suele manifestarse por petequias en la piel, las mucosas y las conjuntivas, y puede producir hematuria, epistaxis y melena. El sangrado de tejidos profundos, pro lo general, es más grave; la hemorragia ocular conduce a perdida de la visión, y en el sistema nerviosos al cuadro clínico de hemorragia cerebral, que es una causa común de muerte en la trombocitopenia.

El tratamiento de la trombocitopenia secundaria depende de la causa. Si con esto no se tiene éxito o el trastorno es idiopático y la vida del paciente esta en peligro por sangrado, como frecuentemente es el caso en la etapa aguda, deberán darse corticosteroides. Si no se observa mejoría a las tres semanas o si no puede mantenerse cuando se reduce la dosificación, como suele ser el caso en pacientes con padecimiento crónico, se efectúa esplenectomía. En caso de urgencia, pueden aplicarse transfusiones de plaquetas pero el anticuerpo presente en la PTI, por lo general, da lugar a destrucción rápida de las plaquetas infundidas y por lo tanto la falta de eficacia clínica.

#### EQUIPO:

Microscopio

Agitador mecánico de pipetas

#### MATERIAL:

- a) Biológico: Sangre obtenida con EDTA
- b) De laboratorio: 1 Pipeta de Thoma para glóbulos blancos con boquilla  
1 Cámara de Neubauer con cubreobjetos  
1 Caja petri  
1 Disco de papel filtro o un trozo de algodón  
Líquido diluyente (oxalato de amonio al 1%)

#### TÉCNICA:

1. Obtener 1 ml de sangre venosa en un tubo al vacío de tapa morada (EDTA). Mezclar la muestra perfectamente.
2. Utilizando una pipeta de Thoma para glóbulos blancos, aspirar sangre hasta la señal 0.5 y posteriormente llenar la pipeta con el líquido diluyente hasta la marca 11.
3. Mezclar inmediatamente el contenido de la pipeta durante 20 a 30 segundos a mano y con el agitador mecánico de pipetas durante 2 ó 3 minutos más.
4. Llenar los dos lados de la cámara de Neubauer, dejando sedimentar la muestra durante 10 ó 15 minutos en una caja petri cuyo fondo esté cubierto por papel filtro o un trozo de algodón húmedos. La muestra no debe dejarse mucho tiempo en la pipeta antes de llevarse a la cámara de recuento.

5. Contar las mismas superficies que para los glóbulos rojos, sacando el promedio de ambas cuadrículas. Las plaquetas se observan como pequeños cuerpos redondos de gran índice de refracción (objetivo 40X). También pueden contarse los glóbulos blancos pues el líquido de dilución no afecta.

#### CÁLCULOS:

Se efectúan de la misma manera que para el recuento de glóbulos rojos, pero el factor de dilución es 20 (no 200), y por lo tanto el número de plaquetas contado se multiplica por 1000 para dar la cifra por  $\text{mm}^3$  de sangre.

#### INTERVALOS DE REFERENCIA:

150,000-400,00 plaquetas / $\text{mm}^3$

FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA  
LABORATORIO DE HEMATOLOGÍA  
PRÁCTICA N.º 21  
“DETERMINACIÓN DE LA FRAGILIDAD CAPILAR”  
**DURACION: 30 minutos**

**OBJETIVO(S):**

Que el alumno ejecute la técnica para la determinación de la fragilidad capilar, identifique las petequias y sea capaz de interpretar los resultados obtenidos.

**FUNDAMENTO:**

Al someter el brazo del paciente a una presión media, entre la sistólica y la diastólica, durante un tiempo determinado, si existe fragilidad capilar en sus capilares, la presión sostenida ocasionará extravasación de sangre por ruptura de los mismos, manifestándose con petequias. La prueba es también conocida como Prueba del Torniquete o Prueba de Rumpel-Leede.

**GENERALIDADES:**

Determinar la fragilidad de las paredes capilares, estima la tendencia a la hemorragia. Ayuda a reconocer la trombocitopenia. Valores aumentados; pueden indicar coagulación intravascular difusa, disminución del fibrinógeno, disminución de la protrombina, deficiencia de factor VII, trombocitopenia, tromboastenia, enfermedad de Von Willebrand, deficiencia de vitamina K. Y puede estar asociado a afecciones no relacionadas con los trastornos de la coagulación como: escarlatina, hipertensión, diabetes, gripe, sarampión, escorbuto. Riesgos del examen; si los capilares son muy frágiles puede haber magulladura.

Las enfermedades que pueden ocasionar fragilidad capilar son:

- ⊗ coagulación intravascular diseminada (CID)
- ⊗ disproteinemia
- ⊗ policitemia vera
- ⊗ púrpura senil
- ⊗ escorbuto
- ⊗ trombastenia
- ⊗ trombocitopenia
- ⊗ deficiencia de vitamina K
- ⊗ enfermedad de Von Willebrand
- ⊗ deficiencia de factor VII
- ⊗ deficiencia de fibrinógeno
- ⊗ deficiencia de protrombina
- ⊗ enfermedad renal crónica
- ⊗ diabetes
- ⊗ hipertensión
- ⊗ influenza
- ⊗ sarampión
- ⊗ escarlatina

La CID es un padecimiento que se observa con frecuencia, en la cual, se consumen plaquetas y fibrinógeno. También se conoce como “síndrome de desfibrinación” o “coagulopatía por consumo”. Es importante tenerla presente por su gravedad, debido a que en muchas situaciones clínicas hay aumento de la utilización de estos componentes hemostáticos que permanecen subclínicos. Puede ocurrir hemorragia anormal o generalizada en diversos defectos graves.

En la patógenia de la CID interviene la activación del sistema de coagulación, generación de trombina, e interacción plaquetaria con consumo de éstas y de fibrinógeno. Como fenómeno secundario, se degradan polímeros de fibrina, filamentos de fibrina pequeños e incluso fibrinógeno por el mecanismo lítico. El estímulo o “disparador” de la coagulación puede ser la activación enzimática directa de un factor de coagulación o la liberación de un procoagulante activador como el factor tisular. Este último se observa *in vitro* con leucocitos estimulados. Los mecanismos alternativos son la iniciación del sistema de contacto a través de la proteasa celular endotelial que puede activar al factor XII, o la activación directa de factores intermedios de la coagulación por proteasas neutras de granulocitos. Es posible que bajo diferentes circunstancias varíen la reacción o reacciones específicas de disparo.

Aunque la hemorragia es una complicación mayor de los estados de consumo, se comenta que el depósito de fibrina en particular en vasos pequeños del riñón, puede dar origen a daño isquémico, análogo a la reacción de Schwartzman en los conejos. Las complicaciones tromboticas en la microcirculación, se relacionan con más frecuencia a alteraciones con consumo de plaquetas predominante, si no es que de manera exclusiva, independiente de la destrucción de fibrinógeno. Una última complicación que rara vez tiene importancia clínica, pero puede servir como ayuda diagnóstica es la anemia hemolítica microangiopática, o sea, la aparición de fragmentos de eritrocitos en frotis de sangre periférica.

El diagnóstico de laboratorio requiere la demostración de un incremento en la utilización de plaquetas y fibrinógeno. Se puede observar un frotis microangiopático en la vasculitis o enfermedad primaria por consumo plaquetario, así como en individuos con hipertensión.

En la eritremia hay aumento verdadero de la masa eritrocitaria. También es frecuente observar un incremento en los leucocitos y las plaquetas y por eso es que se le da el nombre alternativo de policitemia vera. Se desconoce la etiología y el trastorno generalmente se considera como neoplasia benigna. Está clasificado como uno de los trastornos mieloproliferativos y es común la transformación en mielofibrosis. Dicho padecimiento también puede terminar en leucemia mieloblástica aguda, pero, por lo general, sólo en pacientes tratados con fósforo radiactivo. Es más frecuente en hombres que en mujeres. La concentración elevada de hemoglobina se asocia a una viscosidad sanguínea elevada, con estancamiento consiguiente y susceptibilidad a trombosis. No son raras las hemorragias, los síntomas pueden ser: mal estado general, irritabilidad, disnea, palpitations, cefalea, trastornos visuales y vértigo. La muerte puede ser por causas no relacionadas, pero muchos pacientes finalmente sucumben como resultado de trombosis, hemorragia, insuficiencia cardíaca o las complicaciones mielofibrosis. La cuenta plaquetaria frecuentemente se halla arriba de lo normal y en los frotis sanguíneos en ocasiones pueden

observarse fragmentos megacariocíticos. Los hallazgos de laboratorio a veces corresponden a los de una mielofibrosis o una trombocitopenia idiopática.

La trombostenia (enfermedad de Glanzmann) es un raro trastorno hemorrágico hereditario de carácter autosómico recesivo y se caracteriza por tiempo de sangrado prolongado, retracción deficiente del coágulo in vitro de las plaquetas para unirse cuando se añaden ADP, colágena, serotonina o adrenalina. Además hay incapacidad para liberar FP3.

Los trastornos de los vasos sanguíneos generalmente producen púrpura y sangrado de mucosas o equimosis considerables postraumáticas en vez de hemorragias de articulaciones y tejidos profundos. Se dividen en trastornos adquiridos y congénitos. En estos últimos a menudo hay un antecedente de aparición temprana y un antecedente familiar positivo. Los defectos adquiridos pueden obedecer a vasculitis alérgica o ser secundarios a una variedad de factores (infecciones, medicamentos, disproteinemias, deficiencia de ácido ascórbico y edad avanzada).

Los métodos utilizados en el estudio de los vasos sanguíneos y los capilares incluyen la prueba de fragilidad capilar y el tiempo de sangrado. Es común la prueba de la función plaquetaria al mismo tiempo ya que algunos trastornos afectan a capilares y plaquetas y en algunos otros también están defectuosos los valores plasmáticos. Raras veces se requiere biopsia de una porción de piel o músculo para que los vasos puedan examinarse histológicamente.

La púrpura anafilactoide es una arteriolitis generalizada y se debe a una reacción de hipersensibilidad. Es aumento resultante en la permeabilidad vascular produce hemorragias y a la glomerulonefritis en que con frecuencia se presenta después de infección estreptocócica, pero a veces pueden encontrarse otros alérgenos bacterianos. Este padecimiento se halla con más frecuencia en niños y a menudo ocurre una dos o semanas después de faringitis o de infección leve de vías respiratorias superiores. Se presentan una erupción purpúrica a menudo con manchas hemorrágicas más grandes y zonas levantadas, por lo general, sobre el dorso, y las extremidades. Las cuentas de plaquetas son normales o sólo levemente elevadas. La prueba de fragilidad capilar puede ser positiva, pero el tiempo de sangrado suele ser normal. Es posible encontrar títulos elevados de anticuerpos estreptocócicos en el suero.

En las púrpuras vasculares sintomáticas la cuenta de plaquetas suele ser normal aunque puede haber trombocitopenia leve. La prueba del torniquete a menudo es positiva, pero el tiempo de sangrado, por lo general, es normal.

La púrpura senil se ve en personas ancianas. Aparecen equimosis espontáneamente o por presión leve, particularmente en las partes del cuerpo que han estado expuestas a la luz solar. Se desarrolla con el avance de la edad, por la degeneración de las fibrillas de colágena de soporte y la exposición a la radiación actínica. La falta de soporte causa estallamiento de los vasos sanguíneos pequeños y forma equimosis.

El origen de las equimosis en el síndrome de Cushing es similar al de la púrpura senil. Se desconoce el mecanismo que conduce a la aparición de las equimosis, pero es posible que este vinculado con alteraciones del tejido conjuntivo de la pared del vaso sanguíneo o con anomalías de los mucopolisacáridos en los tejidos de soporte.

La terapéutica con dosis grandes de corticosteroides produce equimosis similares a las observadas en el síndrome de Cushing.

El escorbuto es una enfermedad causada por una deficiencia de vitamina C, la cual es necesaria para la síntesis de la colágena. En su ausencia, la colágena es insuficiente o anormal y se produce hemorragia debido a la falta de soporte subendotelial de los vasos. Es característica la presencia de encías hemorrágicas y de hemorragia alrededor de los folículos pilosos de brazos y muslos. También se ven equimosis y hemorragias intramusculares. El tiempo de hemorragia es normal. El tratamiento es con vitamina C por vía oral.

La amiloidosis se presenta como un trastorno primario y de manera secundaria a paraproteinemias como el mieloma múltiple. Es un trastorno en el cual se forman los depósitos de amiloide en la piel, en los tejidos perivasculares y en las paredes de los vasos. Conduce a la fragilidad de los vasos y equimosis. También se puede presentar hemorragia en órganos viscerales y la trombosis es común.

#### EQUIPO:

Esfigmomanómetro

Cronómetro

#### MATERIAL:

- a) Biológico: Ninguno
- b) De laboratorio: Ninguno

#### TÉCNICA:

1. Dibujar en la cara anterior del antebrazo del paciente, un círculo de unos 5 cm de diámetro, aproximadamente a 5 cm por abajo del pliegue del codo., señalando las marcas que puedan confundirse con petequias.
2. Colocar el esfigmomanómetro en el brazo e insuflar hasta el punto medio entre la presión sistólica y la diastólica (80 mm de Hg en un sujeto normal). Esta presión se mantiene durante 5 minutos, después de lo cual se retira el esfigmomanómetro.
3. Transcurrido ese tiempo, examinar el área dentro del círculo y contar las petequias que se hayan formado dentro de él. Esto debe hacerse 5 a 15 minutos después de haber quitado el esfigmomanómetro.
4. Ocasionalmente sucede que no aparecen petequias en el círculo, pero se encuentran en toda la superficie del antebrazo, pliegue del codo y mano. En este caso se da la prueba como positiva pero sin mencionar el número de petequias, interpretando la intensidad de la respuesta en cruces de + a ++++.

#### INTERPRETACIÓN:

- Cifras normales ..... Hasta 10 petequias en el círculo.
- Cifras dudosas ..... Hasta 15 petequias en el círculo.
- Cifras anormales ..... Más de 15 petequias en el círculo.

FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA  
LABORATORIO DE HEMATOLOGÍA  
PRÁCTICA N0. 22  
“RETRACCIÓN DEL COÁGULO”  
**DURACION: 1 Hr 30 min**

#### OBJETIVO(S):

Que el alumno aprenda a efectuar la determinación de la retracción del coágulo, su utilidad clínica, así como su interpretación.

#### FUNDAMENTO:

La sangre que se ha dejado coagular de manera espontánea, después de un cierto tiempo (aproximadamente 30 minutos), sufre una retracción que depende fundamentalmente de la contracción de las proteínas fibrilares del citoesqueleto de las plaquetas y de las glucoproteínas receptoras de membrana.

#### GENERALIDADES:

La disminución en el tiempo de retracción del coágulo puede indicar, entre otras causas:

- número deficiente de plaquetas (trombocitopenia)
- enfermedad de Glanzmann
- enfermedad de Von Willebrand

Otras condiciones para las cuales se puede realizar este examen:

- defecto adquirido en la función de las plaquetas
- defectos congénitos en la función de las plaquetas

La disminución en la cantidad de las plaquetas que circulan en la sangre se define como trombocitopenia. Las plaquetas son las células encargadas de agruparse para formar el coágulo que detiene una hemorragia de sangre. Las causas que provocan esta disminución en la cantidad de plaquetas son variadas, presentaremos las más frecuentes:

- Trombocitopenia por destrucción de plaquetas causada por una enfermedad del sistema inmune. Por razones que afectan el sistema de defensa del organismo, este produce anticuerpos que destruyen las plaquetas, provocando la enfermedad conocida como púrpura trombocitopénica; cuando se presenta en los niños, entre los dos y los seis años, recibe el nombre de púrpura trombocitopénica idiopática aguda y generalmente es secundaria a una enfermedad causada por un virus que desencadena el proceso autoinmune de destrucción de las plaquetas. Dependiendo de la cantidad de plaquetas

destruidas se presentan los síntomas: sangrado por la nariz, vejiga, ojos, etc. en caso de que la destrucción sea masiva. O la aparición de pequeñas hemorragias puntiformes en la piel, que se conocen como petequias, y hemorragias un poco más grandes, conocidas como hematomas. En el examen de sangre se encuentra reducción en el recuento de plaquetas Es de anotar que NO se encuentra crecimiento del bazo (órgano situado en la

parte superior izquierda del abdomen, y que entre otras funciones tiene la de destruir las células anormales que viajen en la sangre), en caso de encontrarse crecido el bazo el diagnóstico posiblemente sea otro trastorno del sistema inmune, como el lupus eritematoso sistémico. Este tipo de púrpura en los niños es transitorio, aunque en algunas oportunidades es aconsejable suministrar corticoides, especialmente cuando el número de plaquetas está muy reducido. En los adultos se presenta un tipo de púrpura trombocitopénica idiopática crónica, que no evoluciona tan favorablemente como la de los niños. Se utilizan corticoides y en caso que no mejore la situación frecuentemente se sugiere la extracción del bazo (esplenectomía)

Existen otras variadas causas que llevan a la trombocitopenia.

- Trombocitopenia causada por drogas: la lista de medicamentos que en algún momento pueden causar alteración en la producción o destrucción de las plaquetas es muy grande, entre ellas hay que considerar algunas de uso cotidiano: los anti-maláricos, la difenilhidantoina, la aspirina, el acetaminofén, la colchicina, la dipirona, las sales de oro, el cloramfenicol, la cefalotina, las sulfas, el trimetropim, la estreptomina, la hidroclorotiazida, la cimetidina, el alopurinol, la digitoxina, etc.

La trombocitopenia es la causa más común de hemorragia grave. La alteración resultante en la formación del tapón hemostático primario es evidente por la relación inversa en la cuenta del tiempo de hemorragia; es importante la correlación con la concentración con la concentración plaquetaria para determinar la actividad funcional plaquetaria específica. Se puede calcular un estimado preliminar de la cuenta plaquetaria a partir del frotis de sangre, pero son necesarias mediciones más precisas.

La secuencia para evaluar el paciente con trombocitopenia grave incluye: 1) antecedentes y examen físico, 2) cuenta plaquetaria y evaluación del frotis sanguíneo, 3) tiempo de hemorragia, 4) pruebas de coagulación, 5) examen médula ósea y 6) estudio de transfusión de plaquetas, con cuenta plaquetaria seriada de seguimiento. El punto clave de la hemorragia trombocitopénica es la aparición de petequias, y se deben buscar lesiones en las áreas de fácil traumatismo y expuestas. En el examen físico hay que poner especial atención en la mucosa bucal y en los tobillos en busca de petequias, adenopatías y organomegalias, también debe llevarse a cabo el examen rectal con prueba de guayaco en evacuaciones. Se completa la evolución de detección con una biometría hemática completa, que incluye, cuenta plaquetaria y examen de frotis sanguíneo. Es importante confirmar la existencia de una cuenta plaquetaria y examen de frotis sanguíneo. Es importante confirmar la existencia de una cuenta plaquetaria baja por medio del examen de frotis sanguíneo bien preparado, además hay que observar el tamaño y forma de las plaquetas. El enfoque clínico descrito por lo general es suficiente para poder categorizar de manera provisional la trombocitopenia es por lo menos una de las tres categorías fisiopatológicas principales - alteraciones de producción, distribución o destrucción- y se puede establecer de manera específica el diagnóstico.

<b>TROMBOCITOPENIA</b>	
<b>MECANISMO</b>	<b>ALTERACIONES ESPECIFICAS</b>
Desórdenes de producción Hipoplasia megacariocítica	Congénitas (anemia de fanconi, síndrome TAR, medicamentos intrauterinos o infecciones) Adquiridas (radiaciones, químicos, insecticida, infecciones, lupus eritematoso)
Producción ineficaz	Hereditaria (tipos autosómicos o ligados a sexo) Adquiridas (deficiencia de vitamina B <sub>12</sub> )
Alteraciones de distribución o dilución	Remanso esplénico Remanso vascular
Alteraciones de destrucción	Consumo combinado de CID Consumo aislado de plaquetas Destrucción de la inmunidad plaquetaria
Alteraciones múltiples	Producción disminuida y desnutrición aumentada Remanso y destrucción aumentados Producción disminuida e ineficaz con aumento de remanso y destrucción.

La tromboastenia de Glanzman es un trastorno hemorrágico hereditario caracterizado por una severa reducción o ausencia de la respuesta de agregación de las plaquetas a múltiples estímulos fisiológicos. Está dado por una anomalía cualitativa o cuantitativa del receptor de la membrana plaquetaria GP IIb/IIIa. La trombostenia es un padecimiento autosómico recesivo que resulta en una tendencia hemorrágica de por vida, de cierta gravedad y es una de las hemorragias congénitas más raras. La cuenta plaquetaria es normal pero el tiempo de hemorragia está muy prolongado y la retracción del coágulo es defectuosa. Las plaquetas no logran la agregación en respuesta a ADP, adrenalina, colágeno o trombina. En contraste directo con el síndrome de Bernard-soulier, las plaquetas trombásticas se adhieren en forma normal al subendotelio, pero no pueden agruparse para la formación del tapón hemostático. La razón por la cual las plaquetas trombásticas no se agregan está relacionada con la alteración en la unión del fibrinógeno a la membrana, que se manifiesta como disminución en las glicoproteínas IIb y IIIa de la membrana plaquetaria. La alteración en la unión del fibrinógeno evita la formación de puentes entre las plaquetas durante la agregación.

El pediatra suizo E. Glanzman describió a un grupo de pacientes con síntomas hemorrágicos y plaquetas "débiles" en 1918. Estudios subsecuentes mostraron que las plaquetas de los pacientes con trombostenia no se agregaban en respuesta a sus agonistas como son la colágena, ADP, trombina y epinefrina, también se observó que la concentración de fibrinógeno era menor o casi nula al igual que la retracción del coágulo.

Fue en 1970 cuando por fin Nurden y Caen descubrieron que las plaquetas de los pacientes trombásticos tenían una deficiencia de un complejo glicoproteico de la membrana denominado GP IIb/IIIa. Más adelante se identificó que este complejo era el responsable de

que las plaquetas formaran puentes de fibrinógeno entre ellas y desde ahí y con las técnicas de clonación e identificación de ADN se han ido encontrando los defectos específicos del complejo y al mismo tiempo se descubre cada vez más acerca de su función.

Esta enfermedad está distribuida en todo el mundo y se ha descubierto que es un trastorno que se hereda en un patrón autosómico recesivo y que se ha encontrado con mayor frecuencia en poblaciones en las que se acostumbra los matrimonios consanguíneos. En las poblaciones en las que se ha encontrado con mayor frecuencia esta enfermedad son: en el Sur de la India, Israelitas descendientes de los judíos-iraquíes, árabes de Israel, Jordania y Arabia Saudita, también se ha identificado en tres familias gitanas. Se ha identificado, después de un extenso análisis de la historia de la población iraquí-judía, que en el presente aproximadamente el 2.3% de dicha población es portador heterocigoto del defecto.

#### EQUIPO:

Baño de agua a 37°C.

#### MATERIAL:

- a) Biológico: Sangre obtenida al momento, sin anticoagulante.
- b) De laboratorio: 1 Tubo de centrífuga graduado de 15 ml o una probeta de 10 ml.  
1 Alambre de cobre o de hierro de 1 a 1.5 mm de diámetro, cuyos últimos 5 cm formen un espiral con unas 10 vueltas aproximadamente.

#### TÉCNICA:

1. En un tubo de centrífuga graduado o en una probeta de 10 ml, colocar 5 ml de sangre venosa recientemente extraída.
2. Introducir el alambre de cobre en forma de espiral hasta el fondo del tubo
3. Incubar el tubo en baño maría a 37°C durante una hora.
4. Transcurrido el tiempo, sacar cuidadosamente el alambre con el coágulo adherido, permitiendo que el suero drene y las células.
5. Leer directamente el volumen de suero y de las células exprimidas del coágulo que queda en el tubo, expresando el resultado como porcentaje del volumen inicial de 5 ml.

$$\% \text{ de Retracción} = \frac{\text{Volumen del líquido exudado} \times 100}{\text{Volumen inicial}}$$

#### INTERVALOS DE REFERENCIA:

Entre 40 y 65%

#### NOTA:

Es una prueba gruesa para medir la capacidad de las plaquetas para retraer el coágulo, aunque también es influida por el fibrinógeno y por el hematócrito.

FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA  
LABORATORIO DE HEMATOLOGÍA  
PRÁCTICA N0. 23  
“DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE COAGULACIÓN Y DEL TIEMPO DE  
SANGRADO”  
**DURACION: 01 HR**

**OBJETIVO(S):**

Que el alumno aprenda a realizar la determinación del tiempo de coagulación y del tiempo de sangrado utilizando técnicas habituales, así como sus correlaciones clínico-patológicas.

**FUNDAMENTO DEL TIEMPO DE COAGULACIÓN (MÉTODO DE LEE Y WHITE):**

Cuando la sangre entra en contacto con una superficie extraña (en este caso, el vidrio del tubo de ensaye) se desencadena la activación del sistema de coagulación. Bajo estas condiciones, el tiempo necesario para que la sangre coagule es la medida de la actividad total del sistema intrínseco de la coagulación.

**GENERALIDADES:**

La prueba para determinar el tiempo de sangría se utiliza para evaluar los factores vasculares (vasos sanguíneos) y plaquetarios asociados con la hemostasia (formación de coágulos de sangre). Cuando ocurre una lesión vascular, la primera respuesta hemostática es la contracción espástica de los vasos lacerados. A continuación, las plaquetas se adhieren a la pared del vaso en la zona lacerada en un intento de taponar el hueco. El fracaso de cualquiera de los dos procesos se traduce en un tiempo de sangría prolongado.

El tiempo prolongado de sangrado puede indicar:

- ⊗ Defectos vasculares (vasos sanguíneos)
- ⊗ Defectos en la función plaquetaria (ver agregación de plaquetas)
- ⊗ Trombocitopenia

Las drogas que pueden aumentar los tiempos de duración del sangrado son dextrano, indometacina y salicilatos (incluyendo dosis altas de aspirina).

Condiciones adicionales para las cuales puede realizarse el examen:

- ⊗ Defectos adquiridos de la función plaquetaria
- ⊗ Defectos congénitos de la función plaquetaria
- ⊗ Deficiencia congénita de proteína C ó S
- ⊗ Hemorragia intracerebral profunda
- ⊗ Deficiencia del factor V
- ⊗ Hemofilia A
- ⊗ Hemofilia B
- ⊗ Shock hemorrágico
- ⊗ Hemorragia intracerebral hipertensiva

- ⊗ Hemorragia intracerebral
- ⊗ Hemorragia intracerebral lobar
- ⊗ Trombocitemia primaria
- ⊗ Enfermedad de Von Willebrand

La hemostasia primaria se evalúa mejor con el tiempo de hemorragia, la cual es una medición *in vivo* de la función de las plaquetas. Existen varios factores que afectan al tiempo de hemorragia, los cuales incluyen el número de plaquetas, su función y la integridad vascular. Se ha usado varios métodos para practicar el tiempo de hemorragia. El método más antiguo “el tiempo de hemorragia de Duke”, usaba una lanceta para hacer una punción en el lóbulo de la oreja. En 1941, Ivy mejoró la técnica del tiempo de hemorragia al crear una presión venosa constante con un manguito de presión arterial y practicar la prueba en el antebrazo con una lanceta. El tiempo de hemorragia con “plantilla” que se usa en la actualidad es una modificación del tiempo de hemorragia de Ivy; la incisión es consistente en longitud y profundidad. En la actualidad se dispone de dispositivos desechables para determinar el tiempo de hemorragia con el propósito de realizarlo con una plantilla.

Para que sea un reflejo verdadero de la función plaquetaria *in vivo*, el paciente debe evitar el uso de aspirina o fármacos similares durante siete días antes de la práctica de la prueba, ya que su ingestión resulta en la prolongación del tiempo de hemorragia. De igual manera debe practicarse un conteo de plaquetas antes del tiempo de hemorragia, ya que una cifra menor de  $100.0 \times 10^9/L$  produce una prolongación del tiempo de hemorragia. Si se cubren las condiciones mencionadas, un tiempo de hemorragia prolongado indica disfunción plaquetaria. Las causas posibles de disfunción de las plaquetas incluyen: disfunciones hereditarias y adquiridas de las plaquetas, enfermedad de von Willebrand, afibrinogenemia, hipofibrinogenemia intensa y algunos trastornos vasculares.

Enfermedad de Von Willebrand; es la más frecuente de las trombopatías y hasta hace poco se consideraba una coagulopatía. Se debe a que no se produce Factor von Willebrand o este es defectuoso. En cualquier caso las plaquetas no se adhieren al colágeno del subendotelio y se produce un cuadro hemorrágico, típico de la alteración de la hemostasia primaria, pero dado que el factor von Willebrand transporta las moléculas de Factor VIII, su ausencia o alteración provoca un cuadro de déficit de Factor VIII, luego una hemofilia A, que puede variar de moderada a grave, dependiendo del grado de alteración del transportador. Existen formas heterocigotas (frecuentes) que producen trastornos moderados y homocigotas o heterocigotas dobles (raras) con hemorragias severas. La clasificación de la enfermedad de von Willebrand se halla en continuo cambio y para ella se utiliza el análisis de la estructura multimérica del factor von Willebrand en el plasma y las plaquetas. La utilidad de conocer la clasificación de las variantes de la Enfermedad de von Willebrand viene condicionada por la utilización del DDAVP. La molécula de este factor es un multímero, que forma una de las moléculas más grande conocida. Este multímero se halla integrado por subunidades. Siendo el número de unidades variable de molécula a molécula, así existirán multímeros de alto peso molecular debido a que poseen muchas subunidades y otros de bajo peso, por las pocas moléculas que llevan. Existen tipos de enfermedad de von Willebrand caracterizada por una mala distribución de estos multímeros

La enfermedad de von Willebrand se sospecha cuando se produce al mismo tiempo que una clínica típica de hemostasia primaria, trastornos más típicos de un déficit coagulativo, así ante una historia familiar positiva se presentan evidencias clínicas de hemorragias de membrana (epistaxis, hemorragia gastrointestinal, menorragia) o hemorragia postquirúrgica o postparto.

El diagnóstico biológico de la enfermedad de von Willebrand se realiza mediante la medida en plasma del factor von Willebrand antigénico, el factor VIII coagulativo, la actividad del factor von Willebrand (actividad cofactor de la ristocetina: se mide enfrentando el plasma del enfermo con plaquetas normales y añadiendo ristocetina), RIPA (Agregación plaquetaria inducida por la ristocetina: se enfrentan el plasma y las plaquetas del enfermo con ristocetina) y la identificación de la estructura multimérica.

El factor von Willebrand se produce por el endotelio y también lo llevan las plaquetas. Es posible extraer todo el Factor von Willebrand del endotelio mediante la administración de DDAVP. Así en enfermos que producen cantidades disminuidas de factor von Willebrand, pero este es de composición normal (Tipo I), la administración de esta sustancia normaliza el defecto, aunque de forma provisional y sujeto a taquifilaxia. En cambio en el Tipo IIB, la administración de DDAVP, produce la aparición de formas que se adhieren a las plaquetas provocando una trombocitopenia in vivo, igual sucede con la forma plaquetar de la enfermedad de von Willebrand o pseudoWillebrand. El Tipo III se caracteriza por su severidad y producir niveles muy bajos de factor von Willebrand en estos casos el DDAVP no puede estimular su secreción por el endotelio. El DDAVP se hallará indicado solo en los tipos I y IIA, la administración del DDAVP debe realizarse con cuidado, ya que provoca efectos indeseables con frecuencia.

Si no puede corregirse el defecto hemostático con DDAVP puede utilizarse el Factor von Willebrand procedente de donaciones de sangre en forma de crioprecipitado. En efecto al congelar el plasma y descongelarlo, se produce un precipitado de proteínas muy ricas en Factor Von Willebrand, y consecuentemente en Factor VIII. Este producto (crioprecipitado), se utiliza en el tratamiento de los episodios hemorrágicos de estos enfermos. Los purificados de Factor VIII se producen rompiendo estas moléculas multiméricas, por ello no son útiles para tratar a estos enfermos. Actualmente existen ya concentrados libres de virus de factor von Willebrand, que carecen de los grandes multímeros, por ello son el producto de elección, cuando existen fenómenos hemorrágicos, en las formas IIB y PseudoWillebrand.

En mujeres afectas del tipo III y I se han observado que la administración de estrógenos disminuye la tendencia hemorrágica, también se ha observado en el uso de anticonceptivos. En casos de intervenciones pequeñas pueden utilizarse agentes antifibrinolíticos (aminocaproico, ac. tranexámico).

Se han asociado déficits de factor XII con enfermedad de von Willebrand. Después de múltiples transfusiones con derivados sanguíneos, algunos enfermos desarrollan anticuerpos precipitantes, que provocarán reacciones anafilactoides al enfermo al ser transfundido.

El diagnóstico diferencial de esta alteración debe realizarse con:

Pseudo von Willebrand: Se caracteriza por presentar una trombocitopenia , una agregación plaquetaria a los crioprecipitados y una biología similar al tipo IIb ( esta variante presenta una hiperrespuesta a la ristocetina )

Von Willebrand adquirido: El Factor von Willebrand es una proteína de fase aguda, que aumenta en muchas condiciones . Pero también puede verse disminuido acompañando otras alteraciones, provocando fenómenos hemorrágicos , que se caracterizan por alargamiento del tiempo de sangría y apenas modificación del APTT . Estas se clasifican en:

- Con autoanticuerpos: Se observa la aparición de una IgG dirigida contra el factor von Willebrand en enfermedades inmunes o tumores del sistema inmunitario. Se detecta, excepto raras ocasiones (trastornos linfoproliferativos) al mezclar plasma del enfermo con sangre normal, provocando la aparición de la anomalía.

Sin autoanticuerpos: Se observa en algunos enfermos con síndromes mieloproliferativos una disminución de los grandes multímeros. También en niños con cardiopatía congénita no cianótica, que mejoran al corregir el trastorno hemodinámico. Así mismo se ha observado un von Willebrand adquirido en la mononucleosis infecciosa, displasias mesenquimatosas (prolapso de válvula, angi displasias intestinales, trastornos del tejido conectivo), hipotiroidismo, tumor de Wilms, hemangioma esplénico y tratamientos con expansores plasmáticos y L-asparaginasa. Los tratamientos trombolíticos pueden asociarse a una disminución de los multímeros de alto peso molecular.

#### EQUIPO:

Baño de agua a 37<sup>0</sup>C

Cronómetro

#### MATERIAL:

- a) Biológico : Ninguno
- b) De laboratorio: 3 Tubos de ensaye de 12 x 75 mm  
Jeringa con aguja

#### TÉCNICA:

1. Extraer algo más de 3 ml de sangre venosa; la punción debe ser perfecta, pues la contaminación con la linfa modifica los resultados.
2. Retirar la aguja y colocar aproximadamente 1 ml de sangre en cada uno de los 3 tubos de ensaye. Inmediatamente que se coloca la sangre en el primer tubo se activa el cronómetro; los 3 tubos se colocan en el baño de agua a 37<sup>0</sup>C.
3. Dos minutos después y reduciendo al mínimo el tiempo que los tubos se encuentran fuera del agua, inclinarlos uno por uno cada 30 segundos. Deberá evitarse la agitación que podría prolongar el tiempo de coagulación; éste corresponde al momento en que resulta posible invertir los tubos sin que se derrame su contenido. Anotar separadamente el tiempo de coagulación de cada tubo y el resultado definitivo será el promedio de los 3 resultados.

**INTERVALOS DE REFERENCIA:**

4-8 minutos

**FUNDAMENTO DEL TIEMPO DE SANGRADO:**

El tiempo de sangrado es el necesario para que deje de sangrar una herida estandarizada de la piel. Es una medida de la función plaquetaria y de la respuesta vascular e independiente del mecanismo de la coagulación, aunque en caso de alteración grave de la coagulación, el tiempo de sangrado puede estar alterado.

**MÉTODO DE DUKE****EQUIPO:**

Cronómetro

**MATERIAL:**

- a) Biológico : Ninguno
- b) De laboratorio: Lancetas desechables  
1 Trozo de papel filtro  
Torundas de algodón con alcohol

**TÉCNICA:**

1. La punción se realiza en el lóbulo de la oreja o la yema del dedo, los cuales deberán calentarse antes de la prueba frotando las zonas con una torunda de algodón.
2. Puncionar el sitio elegido con una lanceta, en el caso del lóbulo de la oreja se deberá hacer la punción en el borde inferior a unos 3 mm de profundidad, poniendo inmediatamente en marcha el cronómetro. La punción deberá hacerse en un solo movimiento, introduciendo la lanceta hasta el fondo y sin hacer movimientos laterales de ésta para no rasgar la piel o hacer más amplia la punción.
3. La sangre deberá salir libremente y el lóbulo no deberá comprimirse.
4. A intervalos de 15 segundos, aplicar cuidadosamente sobre la gota de sangre el borde de un trozo de papel filtro, cuidando de no tocar la piel. Esta maniobra tiene por objeto impedir que se forme un coágulo en la gota de sangre sobre la herida, pues el tiempo de sangrado resultaría falsamente bajo.
5. Utilizando una diferente zona del papel filtro para cada secado puede tenerse un registro conveniente del tiempo total.
6. Se toma como punto final el momento en el cual el papel filtro ya no absorba sangre.

**VALORES DE REFERENCIA:**

1 a 3 minutos ..... Normal  
3 a 5 minutos ..... Dudoso  
Más de 5 minutos ..... Anormal

**VENTAJAS:**

1. Es muy sencillo de realizar

**DESVENTAJAS:**

1. Las condiciones de prueba no son constantes por lo que los resultados son imprecisos.

**MÉTODO DE IVY**

**TÉCNICA:**

1. Colocar en el brazo del paciente un esfigmomanómetro a una presión de 40 mm de Hg, que deberá mantenerse constante durante toda la prueba.
2. Buscar en el antebrazo una zona vascular.
3. Hacer la asepsia con una torunda con alcohol.
4. Con una lanceta estéril y desechable, hacer la punción de un solo golpe y sin hacer rasgaduras laterales. Echar a andar el cronómetro. La punción debe ser de un mm de profundidad y 9 de longitud en condiciones óptimas.
5. En el momento en que sale la gota de sangre, secarla con una tira de papel filtro, procurando no tocar la piel.
6. Repetir esto cada 30 segundos hasta el momento en que el papel filtro ya no absorba sangre.
7. Anotar el tiempo final en el que dejó de sangrar.
8. Repetir la prueba a una distancia de 5 cm de la primera.

**VENTAJAS:**

1. Las condiciones de prueba son constantes, por lo que se obtiene mejor reproducibilidad,

**DESVENTAJAS:**

1. Un poco más laboriosa de realizar.

**INTERVALOS DE REFERENCIA:**

2-6 minutos

**NOTA:**

El tiempo de sangrado es una prueba de pantalla para los desórdenes cualitativos y cuantitativos de las plaquetas y para la enfermedad de Von Willebrand, independiente de los mecanismos de coagulación, aunque los daños severos de éstos, también suele resultar prolongado.

El tiempo de sangrado anormal es una evidencia de defecto en la fase plaquetaria o en la fase vascular de la coagulación. Desafortunadamente, pierde parte de su valor por la dificultad para estandarizar el ancho y la profundidad de la punción, así como las alteraciones del tono vascular. Actualmente, se dispone en el mercado de unas “puntillas” que tienen dos lancetas de longitud y largo estandarizados y que al puncionarse con ésta, por ser mecánica la punción, siempre es homogénea. Hacer la prueba con plantilla, definitivamente, nos proporcionará resultados de más valor.

FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA  
LABORATORIO DE HEMATOLOGÍA  
PRÁCTICA N0. 24  
“DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE PROTROMBINA”  
**DURACION: 30 min**

**OBJETIVO(S):**

Que el alumno aprenda a realizar la determinación del tiempo de protrombina tanto por el método manual como por el automatizado, así como sus correlaciones clínico-patológicas.

**FUNDAMENTO:**

El plasma obtenido de una sangre a la que se ha añadido un anticoagulante que fija el calcio, se coagulará en pocos segundos cuando se recalifique en presencia de tromboplastina hística. El tiempo transcurrido entre la adición de calcio y la presencia de un coágulo es el tiempo de protrombina. El tiempo de protrombina mide la vía extrínseca.

**GENERALIDADES:**

El tiempo de protrombina (TP) es una prueba de detección importante para la evaluación de laboratorio de los pacientes con deficiencias hereditarias o adquiridas en las vías extrínseca o común de la cascada de la coagulación y para la vigilancia de la eficacia de la terapéutica anticoagulante oral. La adición de plasma escaso en plaquetas precalentado al reactivo de tromboplastina-calcio precalentado activa la cascada de la coagulación a través de la formación del complejo tromboplastina (FT)/factor VII. Se requiere tiempo para la formación del coágulo y ésta se puede detectar por métodos ópticos o electromecánicos, con el uso de dispositivos manuales, semiautomáticos o automáticos. Los resultados del TP se registran al medio segundo más cercano. El informe de los resultados debe incluir el resultado del paciente, el intervalo de referencia y la media del intervalo de referencia. Cada laboratorio debe establecer su propio intervalo de referencia.

La organización Mundial de la Salud y el International Committee on Thrombosis and Haemostasis, recomiendan el uso del índice normalizado internacional para informar los resultados del TP cuando se realiza la vigilancia de la terapéutica anticoagulante oral prolongada. Como los resultados del INR son independientes de los reactivos y métodos usados para determinar el TP; estos resultados permiten realizar una mejor evaluación de la terapéutica anticoagulante oral prolongada. El INR es el índice del TP obtenido con el uso de la international Reference Preparation de la OMS como fuente de tromboplastina en la práctica del TP. El índice del TP determinado por el uso de otra tromboplastina debe convertirse al INR.

El tiempo de protrombina mide la activación del factor X por el complejo factor VIIa/FT, así como las reacciones restantes en la vía común. Por tanto, la prueba mide a los factores I, II, V, VII y X. Después de una incubación breve se agrega calcio a la mezcla y se mide el tiempo requerido para que se forme un coágulo.

Se ven anomalías en el TP en trastornos distintos a las deficiencias congénitas del factor. El TP está prolongado en las enfermedades hepáticas y en la ictericia obstructiva. El TP es la prueba de elección para vigilar el tratamiento de los padecimientos tromboticos con cumarina. El TP también esta prolongado en los pacientes con coagulación intravascular diseminada y en las disproteinemias.

La coagulación resulta de una secuencia (cascada) de reacciones que involucran los factores de coagulación, por ejemplo el factor I y el factor II. Algunos de estos factores tienen otros nombres como por ejemplo, Factor I (fibrinógeno), Factor II (protrombina) y Factor XII (factor Hageman). Estas proteínas se producen en el hígado y se segregan en la sangre y algunos de estos factores (es decir, II, VII, IX y X) requieren vitamina K para su síntesis. La sustancia química Coumadin es un medicamento anticoagulante usado regularmente y su propósito es inhibir la enzima que requiere vitamina K en el hígado, la cual impide la formación de algunos de los factores coagulantes, inhibiendo de esta manera la coagulación.

La secuencia de coagulación se inicia cuando los factores de coagulación entran en contacto con el tejido dañado y cada reacción del factor de coagulación activa la próxima reacción. El producto final de la cascada es el coágulo de fibrina (coágulo de sangre).

El factor X se puede activar por medio de dos secuencias separadas de reacciones químicas. A los factores involucrados en las dos secuencias se les llama el sistema intrínseco y extrínseco. El sistema intrínseco involucra el funcionamiento de los factores de Hageman por medio del tejido que normalmente no se encuentra en contacto con la sangre, seguido por el funcionamiento secuencial de los factores XI, IX y X, en presencia del VIII. El sistema extrínseco simplemente involucra el funcionamiento del factor VII por tromboplastina (también llamado factor del tejido), que es una proteína liberada de las membranas de los tejidos dañados.

El TP se utiliza para evaluar la suficiencia del sistema extrínseco y la ruta frecuente en la coagulación; además, mide la capacidad de coagulación de los factores I (fibrinógeno), II (protrombina), V, VII y X. Igualmente, cuando cualquiera de estos factores está presente en cantidades deficientes el TP se prolonga.

#### Factores que intervienen:

Terapia anticoagulante (heparina, warfarina).

Los medicamentos que pueden aumentar los tiempos de TP son entre otros: alopurinol, ácido aminosalicílico, aspirina, antibióticos lactam beta, cefalotinas, cloramfenicol, clorpromazina, colestiramina, cimetidina, clofibrato, colestipol, coumadin, metildopa, neomicina, propiltiouracil, quinidina, quinina, salicilatos y sulfonamidas; mientras que los medicamentos que pueden disminuirlos son: esteroides anabólicos, digitales, difenhidramina, estrógenos, griseofulvina y anticonceptivos orales.

El aumento en la masa de glóbulos rojos conduce a un exceso de anticoagulante en el suero (del anticoagulante en el tubo utilizado para tomar la muestra), produciendo un TP prolongado artificialmente.

Las venas y arterias varían en tamaño de un paciente a otro y de un lado del cuerpo al otro y obtener muestras de sangre puede ser más difícil en unas personas que en otras.

El aumento en los tiempos TP pueden ser indicio de:

- [obstrucción del conducto biliar](#)
- [cirrosis](#)
- [coagulación intravascular diseminada](#)
- [hepatitis](#)
- [malabsorción](#) (absorción inadecuada de nutrientes desde el tracto intestinal)
- deficiencia de [vitamina K](#)
- terapia Coumadin (sustancia química)

Otras condiciones bajo las cuales se puede realizar el examen:

- [defectos adquiridos de la función plaquetaria](#)
- [defecto de función por plaqueta congénita](#)
- [deficiencia congénita de la proteína C o S](#)
- [hemorragia intracerebral profunda](#)
- [CID \(coagulación intravascular diseminada\)](#)
- [deficiencia del factor II](#)
- [deficiencia del factor V](#)
- [deficiencia del factor VII](#)
- [deficiencia factor X](#)
- [síndrome hemolítico urémico \(SHU\)](#)
- [hemofilia A](#)
- [hemofilia B](#)
- [apoplejía hemorrágica](#)
- [encefalopatía hepática](#)
- [síndrome hepatorenal](#)
- [hemorragia intracerebral hipertensa](#)
- [púrpura trombocitopénica idiopática \(PTI\)](#)
- [hemorragia intracerebral](#)
- [hemorragia intracerebral lobular](#)
- [desprendimiento prematuro de la placenta](#)
- [accidente isquémico transitorio \(AIT\)](#)
- [enfermedad de Wilson](#)

Se utilizan tres técnicas para la prueba del tiempo de protrombina en una etapa: la de Quick, la de Owren y la del veneno de víbora de Russell. En el método de Quick, al plasma citratado se le agrega una tromboplastina tisular y calcio, observándose luego el tiempo necesario para que se produzca el coágulo de fibrina. En la modificación de Owren se diluye el plasma 1:10 y el reactivo contiene fibrinógeno de bovino así como tromboplastina. Se anota el tiempo que tarda en formarse la fibrina una vez que se ha añadido calcio. Puesto que el fibrinógeno y el factor VII están presentes en los reactivos de esta prueba, es sensible a los factores V, XII y posiblemente IX. La prueba del veneno de víbora de Russell se efectúa en forma similar, intercambiándose el veneno por la tromboplastina. Puesto que no se requiere factor VII para su actividad, la prueba depende de los otros factores (I, II, V y X).

#### EQUIPO:

Centrífuga

Baño de agua a 37°C

Coagulómetro

#### MATERIAL:

- a) Biológico: Sangre obtenida con citrato de sodio al 3.8%
- b) De laboratorio: 2 Tubos de ensayo de 13 x 100 mm  
3 Tubos de ensayo de 10 x 75 (hemólisis)  
3 Pipetas graduadas de 1 ml  
Cronómetro  
Tromboplastina hística adicionada de sol. De cloruro de calcio 0.02M, liofilizada.  
Solución reconstituyente  
Pipetas automáticas de 100 y 200 microlitros.

#### TÉCNICA POR EL MÉTODO MANUAL:

1. Se obtiene la sangre y se mezcla perfectamente con el anticoagulante mediante suaves inmersiones del tubo.
2. Centrifugar a 2,000 r.p.m. durante 5 minutos y separar el plasma.
3. Reconstituir la tromboplastina tisular de acuerdo a las instrucciones de la etiqueta.
4. Colocar en un tubo de hemólisis, aproximadamente 0.5 ml de la suspensión de tromboplastina hística y colocarlo en baño de agua a 37°C durante 2 minutos.
5. En otro tubo colocar exactamente 0.1 ml de plasma y colocarlo en el baño de agua a 37°C durante 2 a 3 minutos. Al cabo de este tiempo agregar exactamente 0.2 ml de la tromboplastina tisular que se encuentra en el otro tubo que está en el baño de agua e inmediatamente poner en marcha el cronómetro.
6. 8 segundos después y tratando de mantener el tubo dentro del baño lo más posible, someter el tubo a un suave movimiento de vaivén delante de un buen foco de luz, observando el contenido hasta la aparición del coágulo de fibrina. En cuanto éste se forma se para el cronómetro y se registra el tiempo.
7. Deben obtenerse cuando menos 2 registros para cada plasma problema y debe incluirse la determinación con plasma control.
8. Repetir la determinación utilizando el coagulómetro.

INTERVALOS DE REFERENCIA:

10-14 segundos.

TÉCNICA POR EL MÉTODO AUTOMATIZADO (COAGULÓMETRO):

1. Todas las muestras se deben realizar siempre por duplicado.
2. Antes de transcurridos 30 minutos de la extracción, centrifugar la sangre a 750 r.p.m. durante 5 minutos.
3. Separar el plasma y conservarlo en refrigeración hasta su proceso.
4. Procesar simultáneamente un testigo normal del día.
5. Poner una copilla de reacción en el bloque térmico del coagulómetro y agregar 0.2 ml de la tromboplastina cálcica.
6. Incubar por lo menos 2 minutos.
7. Transcurrido ese tiempo, a la copilla con la tromboplastina agregar 0.1 ml del plasma problema echando a andar, simultáneamente, el coagulómetro y el cronómetro.
8. Al iniciarse el coágulo, el coagulómetro se detendrá. Anotar el tiempo, en segundos, en que esto ocurrió.
9. Calcular el porcentaje de actividad usando la curva de calibración realizada previamente en el mismo laboratorio.
10. Convertir el resultado del tiempo, en Índice Normalizado Internacional (INR, de International Normalized Ratio), como más adelante se explica.
11. Debido a que se calculará el porcentaje de actividad de protrombina en la muestra problema, comparada con un normal con actividad de 100%, es necesario hacer previamente una curva de calibración.

TÉCNICA POR EL MÉTODO AUTOMATIZADO (COATRON M1):

1. Encender el instrumento y esperar hasta que el botón de listo (ready) LED esté encendido.
2. Encender la impresora si está conectada.
3. Seleccionar PT como prueba activa.
4. Checar la calibración.
5. Dejar el reactivo paraprecalentamiento al menos 5 minutos.

PROCEDIMIENTO EN EL COATRON M1:

1. Pipetear 25 microlitros de plasma dentro de la cuveta.
2. Precalentar el plasma por un minuto.
3. Transferir la cuveta a la posición de medición.
4. Activar óptico (presionar el botón "optic").
5. Adicionar 50 microlitros de tromboplastina precalentada y simultáneamente iniciar el óptico (presionar el botón "optic" otra vez).
6. Si el instrumento leerá un máximo de 300 segundos. Si no hay coagulación, la pantalla leerá "++++.S".
7. El resultado es mostrado en segundos y INR.

VALORES DE REFERENCIA: 10.7-14.3 SEGUNDOS.

## RECOMENDACIONES DE APLICACIÓN:

1. No usar vidrio. Usar solamente plástico.
2. No retrasar la mezcla de sangre con anticoagulante.
3. Evitar muestras de hemólisis extrema o lipémicas.
4. Evitar plasma contaminado con tejido de tromboplastina.
5. Evitar proporciones impropias de anticoagulante con sangre.
6. Correr muestras de pacientes por duplicado. A diferencias mayores que 5% repetir la prueba.
7. Correr regularmente controles de calidad para confirmar reactivos y la funcionabilidad del instrumento.
8. No correr una prueba, si el LED verde este fuera.

## CURVA DE CALIBRACIÓN:

1. Obtener sangre en un tubo con citrato de sodio, de 5 ó 6 personas normales.
2. Centrifugar las muestras a 750 r.p.m. durante 5 minutos.
3. Tomar de 1.5 a 2 ml de cada plasma y mezclarlos en un tubo de ensayo.
4. Preparar una serie de tubos de la siguiente manera:

TUBO	MEZCLA DE PLASMAS	SOL. SALINA ISOTÓNICA	PORCENTAJE DE ACTIVIDAD
1	1.0 ml	0.0 ml	100%
2	0.9 ml	0.1 ml	90%
3	0.8 ml	0.2 ml	80%
4	0.7 ml	0.3 ml	70%
5	0.6 ml	0.4 ml	60%
6	0.5 ml	0.5 ml	50%
7	0.4 ml	0.6 ml	40%
8	0.3 ml	0.7 ml	30%
9	0.2 ml	0.8 ml	20%
10	0.1 ml	0.9 ml	10%

5. Realizar a cada tubo un tiempo de protrombina por duplicado, la diferencia entre ambos tubos debe ser inferior a 0.5 segundos, en caso contrario se deberá repetir la prueba.
6. Promediar los tiempos obtenidos para cada par de tubos y graficar en papel milimétrico o logarítmico (porcentaje/tiempo) resultando una recta o una parábola, respectivamente. En ningún caso es válido calcular el porcentaje de actividad obteniendo el factor de calibración por regla de tres con el tiempo del testigo normal.

## ÍNDICE NORMALIZADO INTERNACIONAL (INR)

Considerando que el resultado de la medición del tiempo de protrombina se expresa en porcentaje de actividad del plasma normal, y que el tiempo obtenido para éste depende directamente de la sensibilidad de la tromboplastina utilizada, era muy difícil comparar los

resultados obtenidos en laboratorios distintos o aun en el mismo laboratorio con lotes diferentes de reactivo. Esto dificultaba mucha la valoración de la terapia anticoagulante. Por tal motivo, la Organización Mundial de la Salud adoptó un sistema de estandarización internacional del tiempo de protrombina que facilitara la interpretación de los tiempos de protrombina y que proporcionara resultados comparables en todo el mundo.

Para ello, fue indispensable que los fabricantes de tromboplastinas estandarizaran la sensibilidad del reactivo y que en cada lote se identifique ésta como Índice de Sensibilidad Internacional (ISI).

Para calcular el INR es indispensable calcular primero el Índice de Protrombina (IP), que es la relación que existe entre el tiempo de protrombina del paciente y el del plasma normal o testigo del día.

$$\text{IP} = \frac{\text{Tiempo de Protrombina del paciente}}{\text{Tiempo de Protrombina del testigo normal}}$$

$$\text{INR} = (\text{índice de Protrombina})^{\text{ISI}}$$

Generalmente, para facilitar esta tarea, la mayoría de los reactivos comerciales incluye una tabla de conversión para obtener el INR, sin necesidad de hacer cálculos.

#### INTERVALOS DE REFERENCIA:

Normal (no anticoagulación)

Porcentaje de actividad: 70 a 100%

INR 1 a 2

Se sugiere reportar de la siguiente manera:

Tiempo de protrombina:

Testigo del día ..... x segundos

Plasma problema ..... x segundos

Porcentaje de actividad. ....%

INR..... X

#### NOTA:

Dado que el Tiempo de Protrombina mide la vía extrínseca, es el método ideal para el monitoreo de los anticoagulantes orales. La mayoría, como antagonistas de la vitamina K, actúa sobre esta vía. Es muy importante, en estos casos, mantener la dosis terapéutica del anticoagulante y evitar la sobredosis, que ocasionaría sangrado.

Por ello, es indispensable utilizar tromboplastinas estandarizadas con ISI que nos permitan obtener el INR, para poder estandarizar los rangos terapéuticos. Se recomienda reportar siempre el tiempo de protrombina como INR y no como tiempo o porcentaje, ya que con estos últimos se tendrá siempre un margen de mayor error.

Como ejemplo de utilización del INR veamos los recomendados para diversas circunstancias.

**MONITOREO DE ANTICOAGULANTES ORALES  
RANGOS TERAPÉUTICOS**

<b>CONDICIÓN CLÍNICA</b>	<b>RANGO</b>	<b>IDEAL</b>
Prevención de trombosis venosa	1.5 a 2.5	2.0
Prevención de tromboembolia arterial	3.0 a 4.5	3.5
Trombosis venosa activa	2.0 a 4.0	3.5
Tromboembolia pulmonar	2.0 a 4.0	3.5
Anticoagulación oral perioperatoria: a) Involucra cadera b) No involucra cadera	2.0 a 3.0	2.5
	1.5 a 2.5	2.0
Válvulas cardíacas mecánicas	3.0 a 4.5	3.5

Siempre es conveniente procesar, simultáneamente, una muestra para control de calidad, que no garantice la confiabilidad de los resultados. En el mercado existen diversos plasmas como el Verify (Organon) y el Citrol (Dade/Baxter).

FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGIA  
LABORATORIO DE HEMATOLOGÍA  
PRÁCTICA N.º 25

“DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADA”  
**DURACION: 45 min**

**OBJETIVO(S):**

Que el alumno aprenda a realizar la determinación del tiempo de tromboplastina parcial tanto por el método manual como por el automatizado, así como sus correlaciones clínico-patológicas.

**FUNDAMENTO:**

Al plasma anticoagulado se le induce la coagulación reponiendo el calcio que fue inactivado con el anticoagulante y agregando una tromboplastina parcial (fosfolípidos) y un activador de contacto (como caolín, celite, etc), para iniciar la vía intrínseca. Se mide el tiempo transcurrido desde la activación hasta la formación del coágulo, es decir, hasta la formación de fibrina. Por usar un activador de contacto se le denomina “activada”. Dada su forma de activación, mide todos los factores involucrados en la vía intrínseca.

**GENERALIDADES:**

La prueba mide a todos los factores con excepción del VII y el XIII. En esta prueba se incuba una sustancia activadora como caolín, celite o ácido alágico, con plasma para activar los factores de contacto. Cuando tanto el TP como el TTPa son anormales, debe considerarse la posibilidad de contaminación con heparina.

El tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa) es una prueba de detección importante para la evaluación de laboratorio del paciente con deficiencias hereditarias o adquiridas en la vía intrínseca de la cascada de la coagulación, para la vigilancia de la eficacia de la terapéutica anticoagulante con heparina y para detectar inhibidores de la coagulación de la sangre, las deficiencias de la vía común también afecta al TTPa. Se agrega plasma escaso en plaquetas a un volumen igual de reactivo de tromboplastina activada y se calienta a 37° C durante un tiempo de incubación exacto; se agrega reactivo de cloruro de calcio precalentado a la mezcla para activar la cascada de la coagulación en el factor XII. Se registra el tiempo requerido para la formación del coágulo. Ésta se puede detectar por métodos ópticos o electromecánicos con el uso de dispositivos manuales, semiautomáticos o automáticos; los resultados del TTPa se registran en el segundo más cercano. El informe de los resultados debe incluir el resultado del paciente, el intervalo de referencia y la media del intervalo de referencia. Cada laboratorio debe establecer su propio intervalo de referencia.

Si se usa el TTPa en la vigilancia de la terapéutica con heparina, hay cuatro factores que se deben considerar: 1) el tiempo de colección es importante ya que la heparina tiene un efecto anticoagulante inmediato el cual disminuye rápidamente. La vida media in vivo de la heparina es aproximadamente de 1.5 horas. El término “vida media” se refiere al tiempo requerido para que la mitad de la cantidad de una sustancia dada se metabolice en el cuerpo. La muestra debe colectarse con un mínimo de traumatismo y debe tenerse cuidado en centrifugarla adecuadamente para retirar todas las plaquetas, pues éstas son una fuente del factor 4 de la plaqueta, que es un factor neutralizante de la heparina.

El TPT prolongado puede ser indicio de:

- ⊗ Cirrosis
- ⊗ Coagulación intravascular diseminada (CID)
- ⊗ Insuficiencia del factor XII
- ⊗ Hemofilia A (deficiencia del factor VIII)
- ⊗ Hemofilia B (deficiencia del factor IX)
- ⊗ Hipofibrinogenemia
- ⊗ Malabsorción (inadecuada absorción de nutrientes del tracto intestinal).
- ⊗ Deficiencia de vitamina K
- ⊗ Enfermedad von Willebrand

Otras condiciones adicionales bajo las cuales se puede realizar el examen:

- ⊗ Defectos adquiridos de la función plaquetaria
- ⊗ Defecto de función por plaquetacongénita
- ⊗ Deficiencia congénita de la proteína C o S
- ⊗ Hemorragia intracerebral profunda
- ⊗ Deficiencia del factor II
- ⊗ Deficiencia del factor V
- ⊗ Deficiencia del factor VII
- ⊗ Deficiencia del factor X
- ⊗ Síndrome hemolítico urémico (SHU)
- ⊗ Ataque hemorrágico
- ⊗ Hemorragia intracerebral hipertensa
- ⊗ Púrpura trombocitopénica idiopática (PTI)
- ⊗ Hemorragia intracerebral
- ⊗ Hemorragia intracerebral lobular
- ⊗ Lupus anticoagulante
- ⊗ Desprendimiento prematuro de la placenta
- ⊗ Enfermedad de Wilson

Las hemofilias A y B son afecciones heredadas de la coagulación que resultan por defectos en los genes que codifican los factores VIII y IX, respectivamente. Ambos tipos se transmiten como alteraciones del cromosoma X; por tanto, afectan casi en forma exclusiva a los hombres. Las manifestaciones clínicas de las deficiencias de los factores VIII y IX son semejantes. Causan prolongación del tiempo de tromboplastina parcial activada (TPTa) en presencia de un tiempo de protrombina (TP), recuento de plaquetas y tiempo de sangría normal y se presentan con sangrado de las articulaciones y de los tejidos blandos, pero difieren en su tratamiento. La alteración se confirma y define por la medición específica en la actividad de los factores VIII y IX. En general, la severidad clínica se relaciona con el grado de deficiencia del factor. En personas normales los niveles de los factores de la coagulación varían de 50% a 200% (0.5 a 2 unidades internacionales de actividad de factor por ml de plasma). Las personas con deficiencia severa de los factores VIII o IX, menos de 1% de lo normal (0.01 UI/ml) de modo característico tienen sangrados espontáneos frecuentes en las articulaciones y tejidos blandos. Las que tienen valores que se consideran

moderados entre 1% y 5% (0.01-0.05 UI/ml, por lo general presentan hemartrosis ocasionales y hemorragia sólo después de traumatismos. Los individuos con niveles entre 6% y 25% (0.06-0.25 UI/ml tienen una enfermedad leve, sangran sólo en cirugía o después de un trauma significativo. Sin embargo, en ciertas ocasiones algunos pacientes con niveles menores de 1% sangran con menos frecuencia y algunos con niveles altos sangran más de lo esperado.

**EQUIPO:**

Centrífuga

Baño de agua a 37<sup>0</sup>C o bloque térmico para incubación

Cronómetro

Coagulómetro (óptico o mecánico)

**MATERIAL:**

- a) Biológico: Sangre obtenida con citrato de sodio
- b) De laboratorio: 1 Pipeta Pasteur
  - 4 Tubos de ensayo de 12 x 75 (hemólisis)
  - 4 Pipetas graduadas de 1 ml
  - Pipetas automáticas de 100 microlitros
  - Gradilla
  - Copillas de reacción para coagulómetro
  - Tromboplastina parcial líquida activada
  - Cloruro de calcio 0.02 M

**TÉCNICA PARA EL MÉTODO MANUAL:**

1. Una vez obtenida la muestra con citrato de sodio al 3.8%, mezclarla bien y centrifugarla a 3,000 r.p.m. durante 5 minutos y separar el plasma.
2. Colocar en uno de los tubos de hemólisis, aproximadamente 0.3 ml de tromboplastina parcial líquida activada, depositarlos dentro del baño de agua de 37<sup>0</sup>C e incubarlos durante 2 minutos. Al mismo tiempo en otro tubo colocar aproximadamente 0.3 ml de cloruro de calcio 0.02M incubándolo también en el baño de agua.
3. Colocar en otro tubo de hemólisis exactamente 0.1 ml del plasma e incubarlo en el baño de agua durante 2 a 3 minutos. Al cabo de este tiempo agregarle exactamente 0.1 ml de tromboplastina parcial e incubarlo durante exactamente 5 minutos.
4. Transcurridos los 5 minutos añadir 0.1 ml de cloruro de calcio, previamente calentado a 37<sup>0</sup>C y simultáneamente accionar el cronómetro.
5. Colocar de nuevo el tubo en el baño de agua durante 20 segundos. Sacar el tubo y agitarlos con movimientos de vaivén y al observar los primeros hilos de fibrina, parar el cronómetro.
6. Proceder de la misma forma con el otro tubo. El promedio de los 2 registros de tiempo representará el tiempo de tromboplastina parcial.
7. Repetir la determinación utilizando el coagulómetro.

**INTERVALOS DE REFERENCIA:**

22 A 35 segundos.

#### TÉCNICA PARA EL MÉTODO AUTOMATIZADO:

1. Todas las muestras se deben realizar por duplicado.
2. Antes de transcurridos 30 minutos de la extracción, centrifugar la sangre a 750 r.p.m., durante 5 minutos.
3. Separar el plasma y conservarlo en refrigeración hasta su proceso.
4. En sendos tubos de ensayo, incubar a 37°C el cloruro de calcio 0.02M y la tromboplastina, durante 3 minutos, por lo menos. Calcular la cantidad necesaria para las pruebas que se van a realizar (0.1 ml por prueba).
5. Colocar en el bloque térmico del coagulómetro una copilla de reacción y agregar 0.1 ml del plasma problema. Dejar incubar por un minuto.
6. Agregar 0.1 ml de la tromboplastina parcial previamente incubada y dejar incubar exactamente 120 segundos.
7. Transcurrido ese tiempo, agregar 0.1 ml de cloruro de calcio 0.02M, echando a andar el cronómetro y el coagulómetro.
8. Al iniciarse el coágulo, el coagulómetro se detendrá. Anotar el tiempo, en segundos, en que esto ocurrió.

#### TÉCNICA PARA EL MÉTODO AUTOMATIZADO (COATRON M1):

1. Seleccionar PTT como prueba activa.
2. Dejar el cloruro de calcio precalentarse al menos 5 minutos.
3. Pipetear 25 microlitros de plasma dentro de la cuveta.
4. Adicionar 25 microlitros de APTT al plasma.
5. Incubar exactamente por 5 minutos.
6. Transferir la cuveta a la posición de medición.
7. Activar óptico (presionar el botón "optic").
8. Adicionar 25 microlitros de cloruro de calcio precalentado y simultáneamente iniciar el optico (presionar el botón "optic" otra vez).
9. El instrumento leerá en un máximo de 300 segundos. Si no es detectada la coagulación, la pantalla leerá "++++.S".
10. El resultado es mostrado en segundos y proporción.

INTERVALOS DE REFERENCIA: 28-34 segundos.

**NOTA:**

El Tiempo de Tromboplastina Parcial Activado o TTP nos mide los factores involucrados en las vías intrínseca y común. Por ello, es muy utilizado en el monitoreo de terapia con heparina y como un método para buscar deficiencias de los factores que intervienen en dichas vías. Es importante establecer sus propios valores de referencia en cada laboratorio, de acuerdo con el reactivo y el equipo utilizado.

No olvidar la conveniencia de procesar plasmas de control de calidad como el Verify (Organon) o el Citrol (Dade/Baxter).

**FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA****LABORATORIO DE HEMATOLOGÍA****PRÁCTICA N0. 26****“DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE TROMBINA”****DURACION: 45 min****OBJETIVO(S):**

Que el alumno aprenda a realizar la determinación del tiempo de trombina tanto por el método manual como por el automatizado, así como sus correlaciones clínico-patológicas.

**FUNDAMENTO:**

En presencia de un exceso de trombina., el tiempo de coagulación de un plasma, diluido en proporciones adecuadas, está directamente en función de la concentración de fibrinógeno plasmático. La trombina es una enzima que tiene una acción altamente específica sobre el fibrinógeno, transformándolo en fibrina, aun sin la presencia de calcio. La velocidad de coagulación del plasma con la trombina es conocida como Tiempo de Trombina y es inversamente proporcional a la cantidad y funcionalidad del fibrinógeno y directamente proporcional a la acción de inhibidores de la trombina, como la heparina o los productos de degradación de fibrinógeno/fibrina.

**GENERALIDADES:**

La trombina es una poderosa enzima y normalmente no se halla en la sangre, sino que es la forma activada de la protrombina. Una vez formada, la molécula tiene una vida biológica muy breve. Tiene composición similar a la protrombina, pero es más pequeña y tiene peso molecular de 32,000 aproximadamente. Cataliza la conversión del fibrinógeno a fibrina. Además, la trombina tiene otras acciones. Bajo influencia de la trombina, las plaquetas se fusionan en el proceso de metamorfosis viscosa. Activa los factores VIII y V y convierte el factor XIII de forma inactiva a forma activa. Una unidad de trombina se define como la cantidad necesaria para coagular 1 ml de una solución de fibrinógeno estándar en un lapso de 15 segundos a 28° C. Se dispone en el comercio de preparados parcialmente purificados de trombina.

El tiempo de trombina mide la conversión del fibrinógeno en un coágulo de fibrina insoluble. Esta conversión se inicia con la adición de trombina al plasma escaso en plaquetas. La formación de coágulos se puede detectar por métodos ópticos o electromecánicos con el uso de dispositivos manuales, semiautomáticos o automáticos, y los resultados se informan al segundo más cercano. Cada laboratorio debe establecer su propio intervalo de referencia. Los tiempos de trombina prolongada se vinculan con hipofibrinogenemia, disfrinogenemia,

presencia de para proteínas y de anticoagulantes circulantes, incluso heparina, productos de la degradación de la fibrina y plasmina.

Si un TT prolongado es el resultado de contaminación con heparina u otra actividad antitrombina puede agregarse sulfato de protamina a la muestra, el cual neutraliza a la heparina y corrige el tiempo de trombina.

La trombina atiende una función pivote en la formación de tapones hemostáticos. La trombina se genera en forma local en la superficie de la plaqueta por la vía intrínseca y extrínseca. Todas las células lesionadas liberan tromboplastina tisular para activar la coagulación intrínseca. El factor Hageman se activa, tanto por las células endoteliales dañadas como por el tejido conjuntivo subendotelial. Las plaquetas promueven la activación subsecuente de las etapas iniciales de la coagulación intrínseca por un proceso en el que puede formar parte el receptor del factor XI y el cininógeno de alto peso molecular. Los factores V y VII se unen en forma específica a las plaquetas, actúan con los fosfolípidos de la membrana para facilitar la activación del factor X a X<sub>a</sub> en la conversión final de protrombina a trombina.

La coagulación es el resultado de una secuencia (cascada) de reacciones que involucran los factores de coagulación. Algunos de estos factores tienen otros nombres, como factor I (fibrinógeno), factor II (protrombina) y factor XII (factor Hageman). Estas proteínas son producidas en el hígado y secretadas a la sangre. Algunos de los factores (II, VII, IX y X) requieren vitamina K para su sintetización. La warfarina (Coumadin) es una droga "anticoagulante" comúnmente utilizada. Ésta actúa en el hígado inhibiendo la enzima que requiere la vitamina K.

La secuencia de la coagulación se inicia cuando algunos de los factores coagulantes entran en contacto con el tejido lesionado. Cada factor de coagulación dispara la siguiente reacción en la cascada. El producto final de la cascada de coagulación es el coágulo de fibrina (coágulo de sangre).

Las sustancias que inhiben la acción de los factores de coagulación y plasmina, que eventualmente descomponen el coágulo de fibrina, son activadas por el tejido lesionado, al mismo tiempo que los factores de coagulación. Sin embargo, su actividad es más lenta y más prolongada que la de los factores de coagulación. Esto permite que se forme un coágulo para detener el sangrado; luego el coágulo se disuelve (después de un tiempo suficiente para que el tejido se recupere) para restaurar el flujo sanguíneo. El inhibidor de coagulación más importante es la antitrombina III, una proteína que necesita heparina endógena (producida en el organismo) para su actividad.

Las venas y arterias varían en tamaño de un paciente a otro y de un lado del cuerpo a otro, por esta razón puede ser más difícil obtener una muestra de sangre de algunas personas que de otras.

La disminución de la actividad del factor II puede ser producto de:

- ⊗ Deficiencia congénita del factor II
- ⊗ Malabsorción de grasa (esteatorrea)
- ⊗ Administración de heparina
- ⊗ Enfermedad hepática (como la cirrosis)
- ⊗ Deficiencia de vitamina K
- ⊗ Administración de warfarina

Otras condiciones para las cuales se puede realizar este examen:

- ⊗ Deficiencia congénita de la proteína C ó S
- ⊗ CID (coagulación intravascular diseminada)

## **DEFICIENCIA CONGENITA DEL FACTOR II:**

### **Nombres alternativos:**

Hipoprotrombinemia; deficiencia de protrombina.

### **Definición:**

Trastorno de la coagulación sanguínea (formación de coágulos de sangre), debido a la deficiencia de protrombina.

### **Causas, incidencia y factores de riesgo:**

La coagulación sanguínea normal es un proceso muy complicado que requiere la intervención de aproximadamente 20 proteínas plasmáticas diferentes, denominadas factores de coagulación. Con estos factores ocurre rápidamente una serie de reacciones químicas complejas para llevar a la formación de una proteína insoluble llamada fibrina, la cual detiene el sangrado. Cuando falta alguno de los factores de coagulación o su cantidad es insuficiente, la reacción en cadena no se produce de forma normal y como consecuencia se presentan sangrados, los cuales pueden variar de leve a severo.

La deficiencia congénita del factor II es un trastorno hereditario que se da muy rara vez y genera una deficiencia en la coagulación sanguínea. Se hereda como un rasgo autosómico recesivo; es decir que ambos padres deben ser portadores del gen defectuoso. Como es un trastorno hereditario, el tener un antecedente familiar de trastornos hemorrágicos incrementa el riesgo de padecer esta enfermedad.

La forma más común de deficiencia del factor II es la adquirida y puede resultar de la deficiencia de vitamina K, de una enfermedad hepática grave y del uso terapéutico de anticoagulantes. Los factores de riesgo para sufrir la deficiencia de vitamina K incluyen: uso prolongado de antibióticos, obstrucción del tracto biliar y trastornos de malabsorción intestinal (absorción inadecuada de los nutrientes por parte del tracto intestinal). Algunos niños nacen con deficiencia de vitamina K.

### **Síntomas:**

- ⊗ Sangrado del cordón umbilical al nacimiento
- ⊗ Sangrado de la nariz
- ⊗ Sangrado menstrual anormal
- ⊗ Sangrado anormal posterior al parto
- ⊗ Sangrado posterior a un trauma
- ⊗ Sangrado después de una cirugía
- ⊗ Magulladuras

**Tratamiento:**

El sangrado se puede controlar por medio de infusiones controladas de plasma fresco congelado o suministrando suplementos de vitamina K, en el caso de que el problema sea la deficiencia de esta vitamina. Hacer el diagnóstico de un trastorno hemorrágico es importante para poder tomar medidas preventivas en caso de una cirugía programada.

Cuando la enfermedad es congénita, constituye un trastorno hemorrágico que afecta al paciente durante toda la vida. Si la causa es una enfermedad hepática, el resultado final depende de su control adecuado. Finalmente, si el origen del trastorno es la deficiencia de vitamina K, el problema se puede corregir con la administración de esta vitamina.

**EQUIPO:**

Centrífuga

Baño maría a 37°C

Cronómetro

Coagulómetro o fibrinómetro (óptico o mecánico)

**MATERIAL:**

- a) Biológico: Sangre obtenida con citrato de sodio al 3.8%
- b) De laboratorio: 1 Pipeta Pasteur
  - 4 tubos de ensayo de 12 x 75 (hemólisis)
  - 3 Pipetas graduadas de 1 ml
  - 1 Pipeta automática de 100 microlitros
  - Gradilla
  - Copillas de reacción para coagulómetro
  - Trombina cálcica liofilizada (Fibri-Prest)
  - Trombina humana de 4 U/ml o Trombina humana de 5,000 U/ml
  - Solución tampón Owren-Koller

**TÉCNICA PARA EL MÉTODO MANUAL:**

1. Una vez extraída la sangre, mezclarla por inmersión y centrifugarla a 3,000 r.p.m. durante 5 minutos y separar el plasma.
2. Reconstituir un vial de trombina con 2 ml de agua destilada.
3. Hacer una dilución 1:10 del plasma problema con solución tampón.
4. Colocar en uno de los tubos de hemólisis aproximadamente 0.3 ml de trombina, depositarlos dentro del baño de agua a 37°C e incubarlos durante 2 ó 3 minutos.
5. Colocar en otro tubo de hemólisis exactamente 0.1 ml de plasma diluido e incubarlo en el baño de agua durante 1 minuto. Al cabo de este tiempo agregarle exactamente 0.1 ml de trombina y simultáneamente accionar el cronómetro.
6. Colocar de nuevo el tubo en el baño de agua durante 5 segundos. Sacar el tubo e invertirlo ligeramente hasta observar los primeros hilos de fibrina, parar el cronómetro.

7. Proceder de la misma forma con otro tubo. El promedio de los 2 registros de tiempo representará el tiempo de trombina.
8. Repetir la determinación utilizando el coagulómetro o fibrinómetro.
9. Obtener el resultado por lectura directa en la tabla adjunta al equipo de reactivos.

**INTERVALOS DE REFERENCIA:**

2 a 4 g/dl

**TÉCNICA POR EL MÉTODO AUTOMATIZADO:**

1. Todas las muestras se deben realizar siempre por duplicado.
2. Antes de transcurridos 30 minutos de la extracción, centrifugar la sangre a 750 r.p.m., durante 5 minutos.
3. Separar el plasma y conservarlo en refrigeración hasta su proceso.
4. Incubar durante 2 minutos, a 37<sup>0</sup>C, la solución de trombina necesaria para las pruebas que se van a realizar.
5. En el bloque térmico del coagulómetro, colocar copillas de reacción e incubar a 37<sup>0</sup>C , 0.1ml del plasma problema, durante 2 minutos.
6. Agregar 0.1 ml de la solución de trombina de 4 U/ml y echar a andar el cronómetro y el coagulómetro.
7. Al iniciarse el coágulo, el coagulómetro se detendrá. Anotar el tiempo, en segundos, en que esto ocurrió.

**INTERVALOS DE REFERENCIA:**

Es variable para cada laboratorio, de acuerdo con el reactivo, el equipo utilizado y la concentración de la trombina, por lo que es necesario establecer los valores de referencia en cada laboratorio. Generalmente, se estandariza la concentración de trombina para obtener, en plasmas normales, los siguientes valores:

Tiempo de Trombina: 10 a 15 segundos

Cualquier diferencia de por lo menos 5 segundos respecto al testigo normal, se considera significativo.

**TÉCNICA POR EL MÉTODO AUTOMATIZADO (COATRON M1):**

1. Seleccionar TT como prueba activa.
2. Checar calibración.
3. Precalentar los reactivos por lo menos 5 minutos.
4. Pipetear 50 microlitros de plasma dentro de la cuveta.
5. Precalentar la cuveta en la Posición de medición.
6. Activar optic (presionar optic).
7. Adicionar 50 microlitros de trombina (5 NIH) y simultáneamente presionar optic.
8. El instrumento leera en un máximo de 300 segundos.
9. Los resultados apareceran en segundos y en Ratio.

**INTERVALOS DE REFERENCIA:** 13-17 Segundos.

**NOTA:**

El Tiempo de Trombina es un buen método para investigar trastornos cuantitativos del fibrinógeno, o la presencia de inhibidores de la conversión fibrinógeno-fibrina, como la heparina, antitrombinas o la presencia de productos de fibrinogenólisis.

Los resultados de la prueba tienen un mayor valor diagnóstico cuando se acompañan de la cuantificación de fibrinógeno.

En caso de no disponer de trombina de 4U/ml, se puede utilizar una concentración de 5,000 U/ml y hacer la dilución necesaria en solución salina isotónica, para obtener una concentración final de 5U/ml.

FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

LABORATORIO DE HEMATOLOGÍA

PRÁCTICA N.º 27

“CUANTIFICACIÓN DE FIBRINÓGENO” (TROMBINA)

**DURACION: 01 HR**

**OBJETIVO(S):**

Que el alumno aprenda a cuantificar correctamente el fibrinógeno coagulable, así como también identificar la utilidad diagnóstica de su medición.

**FUNDAMENTO:**

Al agregar trombina a una muestra de plasma, el fibrinógeno se transforma enzimáticamente en fibrina, la que rápidamente se polimeriza formándose una red de fibrina soluble. El factor XIII, activado por la trombina, cataliza la formación de las uniones entrecruzadas estables entre las cadenas de fibrina, produciendo un coágulo insoluble. El tiempo transcurrido entre la adición de trombina y la formación del coágulo es inversamente proporcional a la concentración de fibrinógeno.

GENERALIDADES:

Este examen puede realizarse cuando se presenta una coagulación anormal de la sangre, especialmente si hay sangrado excesivo.

El fibrinógeno es una proteína sintetizada por el hígado que se utiliza en el proceso de coagulación de la sangre. Durante la coagulación normal, el fibrinógeno se fusiona (divide) por medio de la enzima trombina para formar péptidos de fibrina. La trombina también activa el factor estabilizador de la fibrina (Factor XIII), el cual se entrecruza con la fibrina monómera, formándose una rejilla para el coágulo de sangre. La acumulación de plaquetas en el sitio de la lesión se facilita mediante la unión de los receptores de la proteína en las membranas celulares de las plaquetas con los péptidos de la fibrina.

Significado de los resultados anormales:

- ⊗ Insuficiencia en la producción fibrinógeno (adquirida o congénita)
- ⊗ Uso excesivo de fibrinógeno (como en la coagulación intravascular diseminada)
- ⊗ Fibrinólisis (ya sea primaria o secundaria)
- ⊗ Hemorragia con transfusión de sangre deficiente en fibrinógeno

Otras condiciones bajo las cuales se puede realizar el examen:

- ⊗ CID (coagulación intravascular diseminada)
- ⊗ Hemofilia A
- ⊗ Hemofilia B
- ⊗ Desprendimiento prematuro de la placenta

## La cascada de la coagulación

La coagulación es llevada a cabo por diversas proenzimas que circulan en forma inactiva a través del torrente sanguíneo, las cuales con activadas por medio de reacciones proteolíticas específicas hasta formar un coágulo de fibrina. Dichas moléculas pueden ser divididas en tres grandes grupos con base en sus propiedades bioquímicas. El primero de ellos constituido por los factores dependientes de vitamina K (II, VII, IX y X), los factores de activación por contacto (XI y XII; precalicreína y cininógeno de alto peso molecular) y los factores sensibles a trombina (V, VII, XIII y fibrinógeno). Las reacciones químicas involucradas han sido divididas en dos sistemas convergentes: la vía intrínseca y la vía extrínseca, que son activados por exposición del tejido extracelular a componentes de la sangre.

La vía intrínseca se inicia cuando el factor XII entra en contacto con la matriz subendotelial cargada negativamente, sufriendo un cambio de conformación que da origen a la variedad activa XIIa. Dicha reacción es acelerada en presencia de cininógeno de alto peso molecular. XIIa activa a su vez a precalicreína que es convertida en calicreína, enzima que convierte mayor número de factor XII en XIIa.

A continuación, el factor XIIa convierte su homólogo XI en XIa, que por su parte transforma el factor IX en IXa. En un paso subsiguiente IXa forma un agregado enzimático con los fosfolípidos de la membrana plaquetaria, calcio y factor VIIIa, para convertir el factor X en Xa. Este último forma el complejo protrombinasa con fosfolípidos aportados por la plaqueta, calcio y factor Va, encargado de transformar a protrombina en trombina.

Esta última constituye uno de los activadores más potentes de la agregación plaquetaria. Al mismo tiempo, transforma los factores VIII y V en sus variedades activas VIIIa y Va. Así mismo, convierte cientos de moléculas de fibrinógeno en fibrina, para formar el tapón hemostático. Por último, activa el factor XIII para dar lugar a XIIIa, molécula que permite la formación de enlaces cruzados entre las moléculas de fibrina para formar una estructura polimérica estable. La vía extrínseca comienza por la interacción del factor tisular (una proteína sintetizada por células endoteliales y macrófagos que han migrado hacia la íntima) con el factor VII para dar lugar al factor VIIa. Este, a su vez, activa de manera directa el factor X para generar Xa, con la producción subsiguiente de trombina.

Para controlar esta serie de reacciones existen bloqueadores naturales de la cascada de la coagulación, que han sido divididos en dos grandes familias: inhibidores de serina proteasas e inhibidores de los factores Va y VIIIa. Al primer grupo pertenece antitrombina III, la cual además de inhibir a la trombina, también bloquea los factores Xa, IXa, XIIa, calicreína y plasmina. Por su parte, los factores Va y VIIIa son inhibidos por la proteína C, que es activada por medio de un complejo enzimático formado por trombina y trombomodulina (una proteína presente en la superficie endotelial). Dicha molécula ejerce su acción con la ayuda de un cofactor, la proteína S, que es una proteína dependiente de vitamina K.

## Fibrinógeno y factor XIII

Ambos están relacionados con la formación de fibrina, por la actuación de la trombina. El fibrinógeno es uno de los mayores constituyentes del plasma. Circula entre dos fuerzas, la trombina en la formación del coágulo y la plasmina implicada en su disolución.

Cuando la trombina actúa enzimáticamente sobre él, "divide" una pequeña "pieza", el llamado fibrinopéptido A y, posteriormente, el fibrinopéptido B. Esto conduce a monómeros de fibrina que inmediatamente se unen formando "polímero". Esa unión se hace más activa bajo la acción del factor XIII, estabilizando el coágulo.

### **Control de los mecanismos de coagulación**

Frente al mecanismo hemostático natural siempre presto a dispararse para producir el coágulo, se dispone otro mecanismo complejo de función inhibitoria o anticoagulante; entre ambos se procura alcanzar el equilibrio dinámico de la homeostasis sanguínea. Acción coagulante y anticoagulante se superponen en un proceso continuo que procura mantener la sangre dentro de los vasos al tiempo que asegura la permeabilidad de su luz.

Los mecanismos que actúan como inhibidores de la coagulación intravascular son varios:

Uno de ellos es el flujo sanguíneo, que arrastra fuera del lugar de la formación del trombo sustancias procoagulantes.

El sistema reticuloendotelial, en cuanto elimina de la sangre circulante los factores activados de la coagulación (en el hígado, bazo y pulmón).

Los anticoagulantes naturales conocidos como antitrombinas; han sido descritas hasta seis variedades, pero las más importantes son: la antitrombina I, que es la fibrina formada actuando como una esponja que absorbe la trombina; la antitrombina II, o cofactor de la heparina, factor plasmático necesario para la acción antitrombínica de la heparina; la antitrombina III, que lleva a cabo la neutralización de la trombina en el suero normal.

El sistema fibrinolítico. Siendo éste el más importante componente del complejo inhibitorio, conviene que le dediquemos una mayor atención.

#### El sistema fibrinolítico

El sistema fibrinolítico está constituido por el plasminógeno, una pro-enzima inactiva, y aquellas sustancias que lo convierten en una forma activa, la plasmina o fibrinolisisina, una enzima proteolítica responsable de la lisis de la fibrina.

Aunque el sistema fibrinolítico es el responsable de la disolución del coágulo, sus componentes también influyen en otros procesos biológicos como la ovulación, implantación embrionaria, activación del SMF, neoplasias, reparación de tejidos y neovascularización.

### *Fase de la coagulación plasmática*

En este estadio del proceso de la hemostasia se distinguen, a su vez, dos periodos: primero, la formación del coágulo y después su lisis. El resultado es que una proteína soluble en el plasma, el fibrinógeno, se convierte en una proteína insoluble, la fibrina. Esta reacción es catabolizada por una enzima, la trombina. Esta no está presente en el plasma o la sangre circulante, pero sí su precursor inerte, la protrombina.

La hipótesis de "cascada" introdujo el concepto de que los factores de coagulación existirían de una forma "inactiva" o procoagulante, y de una forma "activa". La forma activa de un factor activaría específicamente el siguiente de una forma secuencial, dando lugar a la llamada "cascada". El proceso de activación para la mayoría de los factores se lleva a cabo por la "división" de una pequeña parte de la forma inactiva.

La mayoría de los factores activados son serina-proteasas, las cuales son una familia de enzimas proteolíticas con una serina en su centro activo. Los factores serina-proteasa tienen un alto grado de especificidad en el sustrato. Son excepciones el factor V, el factor VIII y el fibrinógeno.

En el siguiente esquema muy simplificado, se encuentra una primera introducción a las secuencias de la coagulación plasmática; en él se distinguen tres estadios:

- ⊗ En el primero se alcanza la formación de la tromboquinasa o tromboplastina.
- ⊗ En el segundo la formación de la trombina.
- ⊗ En el tercero la transformación del fibrinógeno en fibrina.

La trombina, una enzima proteolítica, es pues el factor clave en el proceso que se inicia en la fase anterior a la agregación plaquetaria, comienza la formación de la fibrina e incluso, como después veremos, activa la fibrinasa (factor XIII), enzima que actuando dentro de la molécula de fibrina ya formada, consigue una estructura más resistente.

La presencia de cantidades congénitas bajas de fibrinógeno inmunorreactivo, sin tendencia hemorrágica, se conoce como hipofibrinogenemia, pueden representar heterocigotos de afibrinogenemia. Este último es un carácter autosómico recesivo y poco común reconocible que, por lo general, es una alteración grave, con episodios de hemorragia frecuentes incluso en lactantes. La mayoría de los enfermos con una proteína anormal, disfibrinogenemia, son asintomáticos, pero se les detecta una tendencia a presentar problemas hemorrágicos leves o trombosis. Es más frecuente que la anomalía se manifieste como tiempo de trombina prolongado con o sin fibrinógeno bajo por el método cinético. El fibrinógeno coagulable total es normal. Cuando ocurre la hemorragia anormal, dichos individuos se pueden manejar con crioprecipitado como fuente de concentrado de fibrinógeno. Se ha identificado la polimerización tardía del monómero de fibrina, así como la liberación de fibrinopéptido.

#### EQUIPO:

Coagulómetro (óptico o mecánico)

Bloque térmico para incubación o baño maría a 37°C

Centrífuga

#### MATERIAL:

- a) Biológico: Sangre obtenida con citrato de sodio al 3.8%
- b) De laboratorio: Tubos de ensayo de 10 x 75 mm  
Pipetas automáticas de 100 microlitros  
Pipetas automáticas de 200 microlitros  
Gradilla  
Pipetas Pasteur  
Copillas de reacción para coagulómetro  
Pipetas serológicas de 1 y 5 ml  
Reactivo de Trombina de 100 U.INH/ml de trombina  
Patrón de referencia de fibrinógeno de 200 mg/dl  
Amortiguador de Veronal de Owren

#### TÉCNICA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE FIBRINÓGENO:

1. Todas las muestras se deben realizar siempre por duplicado.
2. Antes de transcurridos 30 minutos de la extracción, centrifugar la sangre a 750 r.p.m. durante 5 minutos.
3. Separar el plasma y conservarlo en refrigeración hasta su proceso.
4. Incubar durante 2 minutos, a 37°C, el reactivo de trombina necesario para las pruebas que se van a realizar.
5. Preparar una dilución 1:10 para cada muestra de paciente y control (0.1 ml de muestra y 0.9 ml de amortiguador de Veronal de Owren).
6. En el bloque térmico del coagulómetro, colocar copillas de reacción e incubar durante 2 minutos a 37°C, 0.2 ml tanto del problema como del control.
7. Agregar 0.1 ml del reactivo de trombina de 100 U.INH/ml y echar a andar, simultáneamente el cronómetro y el coagulómetro.
8. Al iniciarse el coágulo, el coagulómetro se detendrá. Anotar el tiempo, en segundos, en que esto ocurrió.
9. Mediante la curva de calibración, convertir el tiempo en concentración de fibrinógeno en mg/dl.

#### CURVA DE CALIBRACIÓN:

1. Preparar una serie de tubos, como se indica en la tabla de abajo.
2. Procesar cada dilución por duplicado con la técnica descrita previamente.
3. Promediar los tiempos obtenidos y graficar el papel logarítmico tiempo/concentración y trazar una línea entre los puntos.

TUBO	PATRÓN DE FIBRINÓGENO	DILUCIÓN PREVIA	AMORTIGUADOR DE OWREN	CONCENTRACIÓN DE FIBRINÓGENO
1	0.5 ml	-----	2.0 ml	400 mg/dl
2	0.0 ml	1.0 ml	1.0 ml	200 mg/dl
3	0.0 ml	1.0 ml	1.0 ml	100 mg/dl
4	0.0 ml	1.0 ml	1.0 ml	50 mg/dl

**INTERVALOS DE REFERENCIA:**

Fibrinógeno (coagulable) = 200-400 mg/dl

**NOTA:**

A diferencia del fibrinocrito, que mide fibrinógeno proteico, en este método se cuantifica la cantidad de fibrinógeno coagulable. Usarlos en combinación permite distinguir anomalías funcionales del fibrinógeno. Es conveniente establecer los valores de referencia para cada laboratorio y usar como control de calidad un plasma control de pruebas de coagulación como el Verify (Organon Teknika).

**TÉCNICA POR EL MÉTODO AUTOMATIZADO (COATRON M 1 ) PARA LA CUANTIFICACIÓN DE FIBRINÓGENO:**

1. Seleccionar FIB como prueba activa.
2. Checar la calibración.
3. Precalear los reactivos por lo menos 5 minutos.
4. Realizar la dilución del plasma en una proporción 1:10 ( 900 microlitros de IBS + 100 microlitros del plasma).
5. Pipetear 50 microlitros del plasma diluido dentro de la cuveta.
6. Precalear la cuveta en la posición de medición.
7. Activar optic (presionar optic).
8. Adicionar 25 microlitros de trombina y simultáneamente presionar optic.
9. El instrumento leera en un máximo de 60 segundos.
10. Los resultados aparecerán en segundos y en mg/dl.

**RESULTADOS TÍPICOS AL UTILIZAR UN INSTRUMENTO MECÁNICO Y FOTOÓPTICO:**

DILUCIÓN	FBG (mg/dl)	MECÁNICO CT (seg)	ÓPTICO CT (seg)
1:5	56	7.9	4.8
1:10	28	13.5	10.1
1:20	14	22.3	21.0
1:40	7	48.6	37.9

**Bibliografía:**

Chris S. R. Halton, Nevin C Hughes-Jones, Deborah Hay y David Keeling. Hematología: diagnóstico y tratamiento. Primera edición. 2014.

Héctor Rodríguez Moyado, Elisa Quintanar García, Malva H Y Mejía Arregui. El banco de sangre y la medicina transfusional. Segunda edición. Editorial Médica Panamericana. 2014

Beutler, Williams. Hematología (2 volúmenes). Segunda edición. Editorial Marbán. 2005.

Freund. Hematología: Guía práctica para el diagnóstico microscópico. 11ª. Edición. Editorial Médica Panamericana. 2011.

Henry John Bernard. El Laboratorio en el Diagnóstico Clínico (Todd-Sanford). 20ª. Edición. Editorial Marbán. 2005.

Jaime Pérez, José Carlos y Gómez Almaguer, David. Hematología. México 2012. La sangre y sus enfermedades. 3ª. Edición. Mc Graw Hill.

Jaime Pérez, José Carlos. Hematología. México 2007. Editorial McGRAW HILL.

Lewis, S. Hematología práctica 10ª. Edición. Elsevier España, 2008 Lichtman Marshall A., William J Williams. Manual de hematología. Marbán, 2005

Martínez Murillo, C. Quintana González, S. Manual de Hemostasia y Trombosis. Editorial Prado. México. 2001.

Mérida de la Torre, Francisco Javier; Moreno Campoy, Elvira Eva. Manual para técnico superior de laboratorio clínico y biomédico. Madrid 2015. Editorial Marbán.(código: RB38.2 M366 2015)

McKenzie, Shirlyn. Hematología Clínica. El Manual Moderno. 2ª Edición. México 2005

Rodak, Bernadette. Hematología, fundamentos y aplicaciones clínicas. Editorial Médica Panamericana. 2ª. Edición. 2005

Rodak, Bernadette; Carr Jacqueline H. Atlas de hematología clínica. México DF 2014. editorial Panamericana. (Código: RB145 R622 2014)

Ruíz Argüelles, Guillermo. Fundamentos de Hematología. Editorial Médica Panamericana. 4ª Edición. México 2009.

Ruiz Argüelles, Guillermo. Fundamentos de interpretación clínica de los exámenes de laboratorio. 2ª. Ed. Editorial Médica-Panamericana. 2010.

---

San Miguel, J.F. Hematología: Manual básico razonado 3ª. Edición. Elsevier España, 2009

Vives Corrons Joan Lluís, Aguilar Bascompte Josep Lluís. Manual de técnicas de laboratorio en hematología 3ª. Edición. Elsevier España, 2006

Atlas de Hematología on line

<http://www.forobioquimico.com.ar/atlashemato.html>

Henríquez M Katherine I., Chue Lino A., Almanza Edward, Carles Tatiana, De Gracia Kenny, Serracín Demetrio, Goad Kevin L. Atlas de Hematología.

<http://www.telmeds.org/atlas/hematologia/>

Medeiros Nivaldo. Atlas of hematology

<http://www.hematologyatlas.com/>

Ichihashi Takuji, Naoe Tomoki, Kuriyama Kazutaka, Sasada Masataka, Ohno Ryuzo.

Atlas of hematology.

<http://pathy.med.nagoya-u.ac.jp/atlas/doc/index.html>

### **Complementaria:**

---

COLABIOCLI Confederación Latinonamericana de Bioquímica Clínica / Daniel Mazziotta / Camilo Fernández Espina. Gestión de la Calidad en el Laboratorio Clínico. Editorial Médica Panamericana. 2005.

Morán Villatoro, Luis. Obtención de muestras sanguíneas de calidad analítica. Asociación Mexicana de Bioquímica Clínica. Editorial Médica Panamericana. 2004.

Diario oficial. Lunes 17 de febrero de 2003. Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002. Protección ambiental-Salud ambiental-Residuos peligrosos biológico-infecciosos. Clasificación y especificaciones de manejo.

## ALTERACIONES MÁS COMUNES DE LA SERIE ROJA Y SU SIGNIFICADO CLÍNICO

ANORMALIDAD	DESCRIPCIÓN	SIGNIFICADO CLÍNICO
Acantocitos	Glóbulos rojos cuyas prolongaciones no están homogéneamente distribuidas en la célula, además las prolongaciones son frecuentemente filiformes y pueden tener una porción terminal abultada o bifurcada.	Se asocian con alteraciones en los lípidos plasmáticos (a-beta-lipoproteinemia). Desnutrición Grave. Anorexia Nerviosa. Hipotiroidism o Algunas formas de daño hepático.
Anillos de Cabot	Son figuras anulares purpúreas vistas en los reticulocitos, algunas veces adquieren la forma de ocho, de aro o de anillo doblado.	Anemia Megaloblástica grave. Anemia Hipocrómica Grave. Mielofibrosis Síndrome de Digulielmo.
Auer,Bastones	Son estructuras que contienen gránulos azurófilos anormales, cristalinos y contienen mieloperoxidasa. No se encuentran nunca en células normales.	Se encuentran en los Mieloblasto (estrictamente promielocito) Su presencia indica alguna Neoplasia (leucemia)
Basofilia Difusa	Eritrocitos de color azul o gris, que en realidad son reticulocitos y el color se debe a la presencia de ribosomas, más abundantes que en los reticulocitos "normales"	Anemias Hipocrómicas (Anemia por Deficiencia de Hierro) Aumento de Eritropoyesis
Codocitos	Glóbulo rojo en el que la mayor parte de la hemoglobina queda centralizada (blanco de tiro)	Anemia Sideropénica Anemias Hipocrómicas Beta- Talasemia Menor Hemoglobinopatía C

		Hemoglobinopatía S Ictericia Obstructiva
Cuerpos de Heinz	Son inclusiones de los eritrocitos que se presentan por proteínas desnaturalizadas y son visibles con tinciones supravitales como azul de cresil brillante o cristal Violeta	Se presentan en pacientes con Defectos Enzimáticos Hereditarios. Síndromes de Hemoglobinas Inestables. Células Drepanocíticas Irreversibles Post-Esplenectomía
Drepanocitos	Glóbulo rojo en forma de semiluna u hoz.	Hemoglobinopatía S Anemia de Células Falciformes.
Dacriocitos	Glóbulo rojo alargado en un extremo (forma de lágrima)	Mielofibrosis Anemias Mieloptísicas Talasemias Anemias Hipocrómicas Anemias Megaloblásticas Graves.
Eliptocitos	Glóbulo rojo en forma oblonga o elipsoidal que posee extremos simétricamente redondeados y lados casi paralelos	Eliptocitosis Hereditaria Talasemia Deficiencia de Hierro Trastornos Mieloptísicos
Equinocitos	Glóbulos rojos con proyecciones equidistantes y Cortas	Uremia Carcinoma Gástrico Post-Transfusión
Esferocitos	Glóbulo rojo esférico sin centro pálido, su grosor está aumentado y su diámetro disminuido	Esferocitosis Hereditaria Anemias Inmuno hemolíticas Post-Transfusión
Esquizocitos	Glóbulo rojo fragmentado en forma de medio disco con 2 ó 3 extremidades puntiformes o en forma de disco.	Anemia Hemolítica Microangiopática Quemaduras Púrpura Trombótica

Estomatocitos	Glóbulo rojo cuya área bicóncava central aparece como hendidura, la imagen a menudo recuerda a una boca	Esferocitosis Hereditaria Estomatocitosis Hereditaria Alcoholismo Cirrosis
Howell-Jolly cuerpos	Son remanentes nucleares que tienen el color de un núcleo pignótico, son de forma esférica no mayor de 0.5 milimicras que pueden ser únicas o múltiples y se localizan cerca de la periferia de la célula.	Anemias Hemolíticas Anemias Megaloblásticas Pacientes Esplenectomizados
Leptocitos	Eritrocitos delgados, aplanados que tienen un diámetro normal, pero un volumen muy disminuido, la hemoglobina se encuentra en la periferia.	Beta-Talasemia Menor Enfermedad Hepática Obstructiva.
Pappenheimer, cuerpos	Son gránulos de distribución dispareja que contienen hierro y que se tiñen con el colorante de Wright	Anemia Sideroblástica Talasemias
Pilas de monedas	Glóbulos rojos apilados como monedas o platos (del francés Rouleaux = rollos apretados de monedas)	Mieloma Múltiple Macroglubulinemia Anemia Hemolítica
Punteado basófilo(basofilia punteada)	Gránulos eritrocitarios múltiples, pequeños, uniformemente dispersos que se tiñen de azul (o de azul grisáceo o púrpuro) con la tinción de Wright-Giemsa porque se componen de agregados ribosómicos	Pacientes Intoxicados por Plomo. Talasemias. En la mayoría de las anemias, con excepción de la Anemia Ferropénica.
Siderocitos	Glóbulos rojos que contienen gránulos que se tiñen por el hierro, no son visibles en frotis sanguíneos con la tinción de Wright-Giemsa, para poder ser identificados se requiere de la tinción de Perls o Azul de prusia, en donde se observan como gránulos azules o de color azul verdoso	Anemia Sideroblástica

Queratocitos	Glóbulo rojo con una sola espícula resultado de la ruptura de una parte de la membrana	Coagulación Intravascular Diseminada Prótesis Valvulares
Macroцитos	Glóbulos rojos grandes de más de 8.7 milimicras. VGM mayor de 100 fl.	Anemia Megaloblástica Anemia Hemolítica Hepatopatías Hipotiroidismo
Microцитos	Glóbulos rojos pequeños de menos de 6 milimicras	Deficiencia de Hierro Anemia Sideroblástica Talasemia Saturnismo

## ANEXO 02

## PLAN DE MANEJO DE RESIDUOS PELIGROSOS

**1. INTRODUCCIÓN**

De acuerdo al Plan General 2030 de la Universidad Veracruzana, es necesaria una universidad socialmente responsable, comprometida con la cultura de la sustentabilidad y donde impere un compromiso con el cuidado del medio ambiente. Acorde con ello, la Facultad de QFB cuenta con un **Plan de Manejo de Residuos Peligrosos** como herramienta para definir los procedimientos técnicos y administrativos necesarios para el manejo de los residuos peligrosos generados en cada uno de los laboratorios de la Facultad de QFB.

## DESCRIPCIÓN DEL PROGRAMA

<b>2. INTEGRANTES</b>	<b>Encargados del Programa:</b> MIC Izmit Camacho de la Cerda Dra. Abril de los A. Aguilar Tirado MC Mauro A. Villanueva Lendechy QFB Ma. del Refugio López Cruz Dra. Isabel Pérez Lozano MC María Edith Riaño Sánchez
-----------------------	--

<b>3. OBJETIVO</b>	
	Establecer los procedimientos técnicos y administrativos necesarios dentro de la Facultad de QFB para el manejo integral de los residuos peligrosos de acuerdo a la normatividad vigente, con el fin de prevenir el daño al medio ambiente y a la salud humana de acuerdo al compromiso como “Universidad Social y Ambientalmente Responsable”.

<b>4. META</b>	
	La meta es que la disposición de los residuos peligrosos dentro de la Facultad de QFB se realice de acuerdo a este Plan de Manejo, dando como resultado el

	cumplimiento de la normativa vigente y el control sobre los impactos ambientales significativos.
--	--

<b>5. ALCANCE</b>	
	Este plan es aplicable a todos los laboratorios y áreas de trabajo de la facultad de QFB, desde estudiantes hasta el correspondiente personal académico, técnico, administrativo y manual que intervenga en dichas áreas de trabajo.

## MARCO LEGAL

<b>6. MARCO JURÍDICO DEL MANEJO DE RESIDUOS QUÍMICOS PELIGROSOS</b>
<p>El sistema jurídico mexicano está constituido por las disposiciones constitucionales, Leyes Generales y Federales, Reglamentos y Normas Oficiales Mexicanas.</p> <p>Todo lo descrito en el presente plan estará en estricto apego a las políticas institucionales y a la Normatividad Oficial Mexicana en materia de Residuos Peligrosos. A continuación se enlistan las leyes y normas aplicables.</p>

## **7. NORMATIVIDAD APLICABLE A LOS RESIDUOS QUÍMICOS PELIGROSOS**

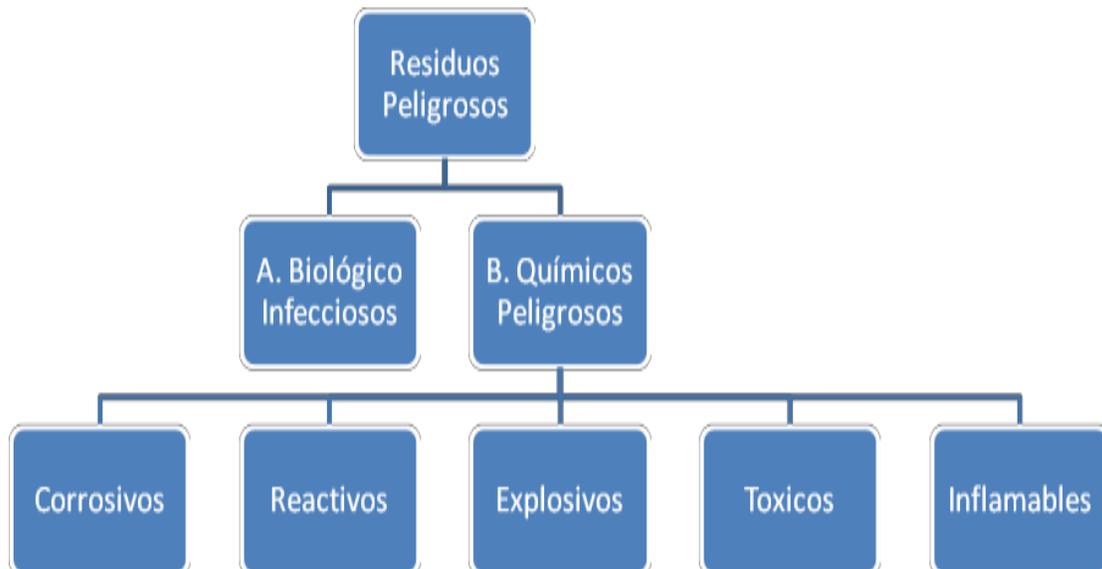
- Ley General del Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente.
- Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos.
- Reglamento de la Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos.
- Reglamento de la Ley general del Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente en Materia de Residuos Peligrosos.
- Reglamento de la Ley general del Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente en Materia de Evaluación del Impacto Ambiental.
  
- Norma Oficial Mexicana NOM-052-SEMARNAT-2005. Establece las características, el proceso de identificación, clasificación y los Residuos Peligrosos
  
- Norma Oficial Mexicana NOM-053-SEMARNAT-1993. Establece el procedimiento para llevar a cabo la prueba de extracción para determinar los constituyentes que hacen un residuo peligroso por su toxicidad al ambiente.
  
- Norma Oficial Mexicana NOM-054-SEMARNAT-1993. Establece el procedimiento para determinar la incompatibilidad entre dos o más residuos considerados como peligrosos por la NOM-052- SEMARNAT- 1993.
  
- Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002 Protección ambiental, salud ambiental, y Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos. Clasificación y especificaciones de Manejo.

## **8. OTRA NORMATIVIDAD RELACIONADA** **Secretaría del Trabajo y Previsión Social.**

- **Reglamento Federal de Seguridad, Higiene y Medio Ambiente de Trabajo** (D.O.F. 21 de Enero de 1997). Establece las medidas necesarias para la prevención de accidentes y enfermedades de trabajo.
- **NOM-005-STPS-1993**, Relativa a las condiciones de seguridad e higiene en los centros de trabajo para el almacenamiento, transporte y manejo de sustancias inflamables y combustibles.
- **NOM-118-STPS-2000**, Establece el sistema para la identificación y comunicación de peligros y riesgos por sustancias químicas peligrosas en los centros de trabajo.
- **NOM-002-SCT2-94**. Listado de las sustancias y materiales peligrosos más usualmente transportados.
- **NOM-007-SCT2-1994**. Marcado de envases y embalajes destinados al transporte de sustancias y residuos peligrosos.
- **NOM-010-SCT-1994**. Disposiciones de compatibilidad y segregación, para el almacenamiento y transporte de sustancias, materiales y residuos peligrosos.

<b>9. CONCEPTOS BÁSICOS</b>	
<b>¿Qué es un Residuo?</b>	<p>Un residuo es todo material o producto que se desecha y que se encuentra en estado sólido, semisólido, líquido o gaseoso, contenido en recipientes o contenedores es decir, cualquier material que ya no sea útil a la persona que lo empleaba, producto de reacciones y/o como resultado de las prácticas de laboratorio; incluye cualquier insumo o materia prima caducada o que haya perdido las características por las cuales fue adquirido. Dicho residuo puede ser susceptible de ser valorizado o sujetarse a tratamiento o disposición final, conforme a lo dispuesto en la LGPGIR y demás ordenamientos que de ella derive. Se pueden clasificar en:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>a. Biológico Infecciosos</li><li>b. Químicos Peligrosos</li></ul>
<b>¿Qué es un Residuo Químico Peligroso?</b>	<p>Es aquella sustancia química que posea alguna de las características de <b>corrosividad (C)</b>, <b>reactividad (R)</b>, <b>explosividad (E)</b>, <b>toxicidad (T)</b> e <b>inflamabilidad (I)</b>, o que contengan agentes que le confieran peligrosidad; así como envases, recipientes, embalajes y suelos que hayan sido contaminados cuando se transfieran a otro sitio, de conformidad con lo que se establece en la LGPGIR.</p>
<b>¿Qué implicaciones tienen las propiedades de los residuos?</b>	<p>Su forma de manejo depende de cada propiedad y demanda conocer el tipo de precauciones a seguir, de envases a emplear, de almacenamiento que requieren, de</p>

	<p>equipos de protección con los que hay que contar, así como de materiales a emplear para amortiguar derrames o apagar incendios.</p>
<p><b>¿Qué es un Residuo Biológico Infeccioso?</b></p>	<p>Es cualquier material que contenga agentes biológico-infecciosos es decir, con cualquier microorganismo capaz de producir enfermedades cuando está presente en concentraciones suficientes, en un ambiente propicio, en un hospedero susceptible, en presencia de una vía de entrada y que puedan causar efectos nocivos a la salud y al ambiente.</p>



<b>REACTIVO (R)</b>	
<p>Cuando una muestra representativa en estado líquido o sólido, después de ponerse en contacto con el aire se inflama en un tiempo menor a 5 min, sin que exista una fuente externa de ignición. Cuando se pone en contacto con agua reacciona espontáneamente y genera gases inflamables en una cantidad mayor a 1 L/kg del residuo por hora. Posee en su constitución cianuros o sulfuros liberables, cuando se expone a condiciones ácidas.</p>	

<b>EXPLOSIVO (E)</b>	
<p>Cuando una muestra representativa tiene una constante de explosividad, mayor o igual al nitrobenzeno. Es capaz de producir una reacción o descomposición detonante o explosiva a 25°C y a 1.03 kg/cm<sup>2</sup> de presión.</p>	

<b>TÓXICO (T)</b>	
<p>Cuando la muestra representativa se somete a la prueba de extracción para toxicidad conforme a la norma oficial mexicana NOM-053-SEMARNAT-1993, el lixiviado contiene cualquiera de los constituyentes listados en las tablas 5, 6 y 7, en concentraciones mayores a los límites señalados en dichas tablas <i>por ejemplo: Arsénico 5.0 mg/L, Níquel 5.0 mg/L, Mercurio 0.2 mg/L, Plata 5.0 mg/L, Cloroformo 6.0 mg/L, Fenol 14.4 mg/L.</i></p>	

<b>INFLAMABLE (I)</b>	
<p>Cuando una solución acuosa contiene más del 24% de alcohol en volumen. Cuando es un líquido y tiene un punto de inflamación inferior a 60°C. Cuando no es líquido pero es capaz de provocar fuego por fricción, absorción de humedad o cambios químicos espontáneos (a 25°C y a 1.03 kg/cm<sup>2</sup>). O bien, se trata de gases comprimidos inflamables o agentes oxidantes que estimulan la combustión.</p>	

## DESCRIPCION DEL PLAN DE MANEJO DE RESIDUOS PELIGROSOS

<b>10. IDENTIFICACIÓN DE LOS PUNTOS DE GENERACION DE LOS RESIDUOS PELIGROSOS EN LA FACULTAD DE QFB</b>	
LABORATORIO 101	Residuos Químicos Peligrosos
LABORATORIO 102	Residuos Químicos Peligrosos
LABORATORIO 103	Residuos Químicos Peligrosos y RPBI
LABORATORIO 104	Residuos Químicos Peligrosos y RPBI
LABORATORIO 105	RPBI
LABORATORIO DE TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA	Residuos Químicos Peligrosos

## 11. IDENTIFICACIÓN DE RESIDUOS PELIGROSOS

La identificación de residuos peligrosos de tipo químico se realizará tomado en cuenta que una sustancia ha perdido sus características intrínsecas, sus propiedades han dejado de ser útiles para el usuario, se encuentran fuera de especificaciones, han caducado, así como las sustancias químicas que han perdido, carecen o presentan variación en sus características intrínsecas para ser utilizadas, transformadas respecto a los estándares de diseño o producción originales, por lo que se deben manejar como residuos con “características peligrosas”. Un residuo es considerado peligroso (de acuerdo a la normatividad vigente), cuando independientemente de su estado físico presenta alguna o más de las características de peligrosidad como Corrosividad, Explosividad, Toxicidad e Inflamabilidad. Es importante reconocer la diferencia entre un residuo y una sustancia, con la finalidad de que en las segundas, sean aprovechadas al máximo sus propiedades químicas originales y no se desechen cuando éstas aún no han sido agotadas ya que no serían consideradas como residuos. Una sustancia tóxica es aquella que puede producir en organismos vivos, lesiones, enfermedades,

implicaciones genéticas o muerte. Un residuo es cualquier material generado en los procesos de extracción, beneficio, transformación, producción, consumo, utilización, control o tratamiento cuya calidad no permita usarlo nuevamente en el proceso que lo generó.

**ETIQUETA DE IDENTIFICACION DE RESIDUOS DENTRO DE LA FACULTAD DE QFB**

<b>PELIGRO</b>						
<b>CONTIENE UN RESIDUO PELIGROSO</b>						
<b>Nombre del Residuo:</b>						
<b>Características del Residuo:</b>	<b>C</b> <small>Corrosivo</small>	<b>R</b> <small>Reactivo</small>	<b>E</b> <small>Explosivo</small>	<b>T</b> <small>Tóxico</small>	<b>I</b> <small>Inflamable</small>	<b>B</b> <small>Biológico- Infeccioso</small>
<b>Estado físico:</b>	<b>S</b> <small>Sólido</small>		<b>L</b> <small>Líquido</small>		<b>G</b> <small>Gaseoso</small>	
<b>ESTE RESIDUO DEBERÁ SOMETERSE A TRATAMIENTO LEYES FEDERALES PROHÍBEN SU DISPOSICIÓN INADECUADA</b>						
<b>Si usted localiza este contenedor almacenado o desechado de manera inapropiada, de manera que represente un riesgo a la salud o el medio ambiente, por favor repórtelo a las siguientes instancias</b>						
<b>Nombre del generador</b>			<b>Nombre de la empresa responsable de su traslado y/o tratamiento y/o disposición final</b>			
Facultad de Química Farmacéutica Biológica - Xalapa Universidad Veracruzana  Dirección: Circuito Gonzalo Aguirre Beltrán s/n, Zona Universitaria, Xalapa de Enríquez, Veracruz. CP 91000  Teléfono: 01 228 842 1759			ECOENTRONO S.A. DE C.V.  Dirección: Carretera Las Trancas-Coatepec No. 14. Col. Rafael Guízar y Valencia, Xalapa de Enríquez, Veracruz. CP 91637  Teléfonos: 01 (228) 813-7262 y 813-7241			
<b>Fecha de generación</b>			<b>Fecha de entrega para su traslado</b>			

## **12. CLASIFICACIÓN DE RESIDUOS PELIGROSOS**

### **A) QUÍMICOS**

Para poder saber si los residuos que se generan en cualquier actividad, son o no peligrosos, existe un procedimiento, el cual se detalla a continuación:

**1.-** Un residuo es peligroso, si está listado en el Artículo 31 de la Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos (LGPGIR), la cual define a los siguientes residuos peligrosos:

- a) Aceites lubricantes usados
- b) Disolventes orgánicos usados
- c) Convertidores catalíticos
- d) Sustancias o mezcla de sustancias con metales pesados como plomo
- e) Baterías a base de mercurio o de níquel-cadmio
- f) Lámparas fluorescentes y de vapor de mercurio
- g) Aditamentos que contengan mercurio, cadmio o plomo
- h) Fármacos
- i) Plaguicidas y sus envases, que contengan remanentes de los mismos.
- j) Compuestos orgánicos persistentes como los bifenilos policlorados
- k) Lodos de perforación base aceite, provenientes de la extracción de combustibles fósiles y lodos provenientes de plantas de tratamiento de aguas residuales cuando sean considerados como peligrosos.

**2.-** Si el residuo no se clasifica como peligroso en el Artículo 31 de la LGPGIR, se debe consultar en los cinco listados de la Norma Oficial Mexicana NOM- 052-SEMARNAT-2005, que establece las características, procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos (residuos químicos peligrosos por fuente específica o no específica, residuos peligrosos resultado del desecho de productos químicos fuera de especificaciones o caducos (Tóxicos Agudos y crónicos) y residuos sujetos a Condiciones Particulares de Manejo o bien se puede determinar su peligrosidad mediante el análisis CRETI que se realiza, a fin de identificar si el residuo presenta cualquiera de las siguientes características; Corrosividad, Reactividad, Explosividad, Toxicidad ambiental, Inflamabilidad. Es

importante mencionar que la identificación de las características de explosividad es mediante revisión bibliográfica.

3.- Para la elaboración de listados dentro de la facultad, además deberán enlistarse de la siguiente forma:

- Sustancias ácidas
- Sustancias básicas
- Sustancias inorgánicas sólidas
- Sustancias inorgánicas líquidas
- Sustancias orgánicas sólidas
- Sustancias orgánicas líquidas
- Solventes
- Plaguicidas
- Metales Pesados

### **13. CLASIFICACIÓN DE RESIDUOS PELIGROSOS B) BIOLÓGICO INFECCIOSOS**

Para efectos de la NOM 087 se consideran residuos peligrosos biológico- infecciosos los siguientes:

- La sangre
- La sangre y los componentes de ésta, sólo en su forma líquida, así como los derivados no comerciales, incluyendo las células progenitoras, hematopoyéticas y las fracciones celulares o acelulares de la sangre resultante (hemoderivados).
- Los cultivos y cepas de agentes biológico-infecciosos
- Los cultivos generados en los procedimientos de diagnóstico e investigación, así como los generados en la producción y control de agentes biológico- infecciosos.
- Utensilios desechables usados para contener, transferir, inocular y mezclar cultivos de agentes biológico-infecciosos.
- Los patológicos

- Los tejidos, órganos y partes que se extirpan o remueven durante las necropsias, la cirugía o algún otro tipo de intervención quirúrgica, que no se encuentren en formol.
- Las muestras biológicas para análisis químico, microbiológico, citológico e histológico, excluyendo orina y excremento.
- Los cadáveres y partes de animales que fueron inoculados con agentes enteropatógenos en centros de investigación y bioterios.
- Los residuos no anatómicos

Son residuos no anatómicos los siguientes:

- Los recipientes desechables que contengan sangre líquida.
- Los materiales de curación, empapados, saturados, o goteando sangre o cualquiera de los siguientes fluidos corporales: líquido sinovial, líquido pericárdico, líquido pleural, líquido Céfaló-Raquídeo o líquido peritoneal.
- Los materiales desechables que contengan esputo, secreciones pulmonares y cualquier material usado para contener éstos, de pacientes con sospecha o diagnóstico de tuberculosis o de otra enfermedad infecciosa según sea determinado por la SSA mediante memorándum interno o el Boletín Epidemiológico.
- Los materiales desechables que estén empapados, saturados o goteando sangre, o secreciones de pacientes con sospecha o diagnóstico de fiebres hemorrágicas, así como otras enfermedades infecciosas emergentes según sea determinado por la SSA mediante memorándum interno o el Boletín Epidemiológico.
- Materiales absorbentes utilizados en las jaulas de animales que hayan sido expuestos a agentes enteropatógenos.
- Los objetos punzocortantes
- Los que han estado en contacto con humanos o animales o sus muestras biológicas durante el diagnóstico y tratamiento, únicamente: tubos capilares, navajas, lancetas, agujas de jeringas desechables, agujas hipodérmicas, de sutura, de acupuntura y para tatuaje, bisturís y estiletes de catéter, excepto todo material de vidrio roto utilizado en el laboratorio, el cual deberá desinfectar o esterilizar antes de ser dispuesto como residuo municipal.

TIPO DE RESIDUOS	ESTADO FISICO	ENVASADO	COLOR
4.1 Sangre	Líquidos	Recipientes herméticos	Rojo
4.2 Cultivos y cepas de agentes infecciosos	Sólidos	Bolsas de polietileno	Rojo
4.3 Patológicos	Sólidos	Bolsas de polietileno	Amarillo
	Líquidos	Recipientes herméticos	Amarillo
4.4 Residuos no anatómicos	Sólidos	Bolsas de polietileno	Rojo
	Líquidos	Recipientes herméticos	Rojo
4.5 Objetos punzocortantes	Sólidos	Recipientes rígidos polipropileno	Rojo

En las áreas de generación se deberán separar y envasar todos los residuos peligrosos biológico-infecciosos, de acuerdo con sus características físicas y biológicas infecciosas, conforme a la tabla. Durante el envasado, los residuos peligrosos biológico-infecciosos no deberán mezclarse con ningún otro tipo de residuos municipales o peligrosos.

- 1) Las bolsas deberán ser de polietileno de color rojo translúcido de calibre mínimo 200 y de color amarillo translúcido de calibre mínimo 300, impermeables y con un contenido de metales pesados de no más de una parte por millón y libres de cloro, además deberán estar marcadas con el símbolo universal de riesgo biológico y la leyenda Residuos Peligrosos Biológico-Infecciosos.
- 2) Las bolsas se llenarán al 80 por ciento (80%) de su capacidad, cerrándose antes de ser transportadas al sitio de almacenamiento temporal y no podrán ser abiertas o vaciadas.
- 3) Los recipientes de los residuos peligrosos punzocortantes deberán ser rígidos, de polipropileno color rojo, con un contenido de metales

pesados de no más de una parte por millón y libres de cloro, que permitan verificar el volumen ocupado en el mismo, resistentes a fracturas y pérdidas de contenido al caerse, destructibles por métodos físicos, tener separador de agujas y abertura para depósito, con tapa(s) de ensamble seguro y cierre permanente, deberán contar con la leyenda que indique "RESIDUOS PELIGROSOS PUNZOCORTANTES BIOLÓGICO-INFECCIOSOS" y marcados con el símbolo universal de riesgo biológico.

- 4) Los recipientes de los residuos peligrosos líquidos deben ser rígidos, con tapa hermética de polipropileno color rojo o amarillo, con un contenido de metales pesados de no más de una parte por millón y libres de cloro, resistente a fracturas y pérdidas de contenido al caerse, destructible por métodos físicos, deberá contar con la leyenda que indique "RESIDUOS PELIGROSOS LIQUIDOS BIOLÓGICO- INFECCIOSOS" y marcados con el símbolo universal de riesgo biológico.

#### **ALMACENAMIENTO RPBI**

- Se deberá destinar un área en la facultad para el almacenamiento temporal de los residuos peligrosos biológico-infecciosos. Los residuos peligrosos biológico-infecciosos envasados deberán almacenarse en contenedores metálicos o de plástico con tapa y ser rotulados con el símbolo universal de riesgo biológico, con la leyenda "RESIDUOS PELIGROSOS BIOLÓGICO-INFECCIOSOS".
- Los residuos patológicos, humanos o de animales (que no estén en formol) deberán conservarse a una temperatura no mayor de 4°C (cuatro grados Celsius), en las áreas de patología, o en almacenes temporales con sistemas de refrigeración o en refrigeradores en áreas que designe el responsable del establecimiento generador dentro del mismo.

<b>14. MEDICIÓN</b>	
Unidades de medición	La medición se realizará de acuerdo al estado del residuo, es decir, si es sólido será en gramos y kilogramos; si es líquido será en mililitros y litros.
Frecuencia	Los residuos se recolectarán al final de cada práctica de laboratorio, se almacenaran temporalmente en el área destinada para ello y posteriormente se procederá al trámite de su retiro de manera semestral en el caso de los Residuos Químicos, para el caso de los Residuos RPBI el retiro se efectuará semanalmente.
Confinamiento	Específico para cada laboratorio y área de refrigeración de la Facultad de QFB.

<b>15. RECOLECCIÓN Y TRANSPORTE INTERNO</b>
<p>La recolección y transporte interno de los residuos químicos peligrosos, así como de los residuos peligrosos biológico infecciosos, hacia el área de almacenamiento temporal, se encuentra a cargo de los técnicos académicos de la Facultad de cada uno de los laboratorios, y es realizada al término de cada práctica de laboratorio. Para la recolección se deben utilizar los contenedores y las etiquetas de recolección específicos para este tipo de residuos, que cumplan con las características de seguridad y que sean</p>

confiables para el desarrollo de los trabajos de recolección y transporte interno hacia el área de almacenamiento.

El personal a cargo de la recolección interna de residuos peligrosos químicos, deberá tener conocimiento de las características de los residuos que maneja, de tal forma que responda adecuadamente durante una contingencia o un posible accidente de derrame con este tipo de residuos, independientemente que deberá de reportar el incidente de forma inmediata al área generadora, así como a quien corresponda, con la finalidad de establecer un plan de contingencia. Debe portar equipo de seguridad consistente cuando menos de: bata u overol, guantes adecuados al tipo de residuo manejado, zapatos cerrados y lentes de protección. Si se recolectan gases, deberá utilizar la mascarilla con filtro de aire. Se deberá evitar recolectar al mismo tiempo residuos que sean incompatibles entre sí, para prevenir accidentes.

Los residuos sólidos peligrosos serán almacenados en el Sitio de Almacenamiento Temporal de Residuos Peligrosos que deberá cumplir con las exigencias mínimas, por un período no mayor a 6 meses, en condiciones seguras y con la segregación necesaria para garantizar condiciones de seguridad.

Estas exigencias mínimas tienen relación con:

- No verter residuos en lugares no autorizados o no especificados para ese tipo de residuo.
- Desechar los residuos en forma diferenciada y debidamente identificados.
- Uso obligatorio de los elementos de protección personal.

El sitio de almacenamiento temporal de residuos peligrosos tendrá las siguientes características:

**Condiciones básicas para las áreas de almacenamiento, consistentes en:**

- a) Estar separadas de las áreas de producción, servicios, oficinas y de almacenamiento de materias primas o productos terminados;
- b) Estar ubicadas en zonas donde se reduzcan los riesgos por posibles emisiones, fugas, incendios, explosiones e inundaciones;

- c) Contar con dispositivos para contener posibles derrames, tales como muros, pretilas de contención o fosas de retención para la captación de los residuos en estado líquido o de los lixiviados;
- d) Cuando se almacenan residuos líquidos, se deberá contar en sus pisos con pendientes y, en su caso, con trincheras o canaletas que conduzcan los derrames a las fosas de retención con capacidad para contener una quinta parte como mínimo de los residuos almacenados o del volumen del recipiente de mayor tamaño;
- e) Contar con pasillos que permitan el tránsito de equipos mecánicos, eléctricos o manuales, así como el movimiento de grupos de seguridad y bomberos, en casos de emergencia;
- f) Contar con sistemas de extinción de incendios y equipos de seguridad para atención de emergencias, acordes con el tipo y la cantidad de los residuos peligrosos almacenados;
- g) Contar con señalamientos y letreros alusivos a la peligrosidad de los residuos peligrosos almacenados, en lugares y formas visibles;
- h) El almacenamiento debe realizarse en recipientes identificados, considerando las características de peligrosidad de los residuos, así como su incompatibilidad, previniendo fugas, derrames, emisiones, explosiones e incendios; y
- i) La altura máxima de las estibas será de tres tambores en forma vertical.

**Condiciones para el almacenamiento en áreas cerradas, consistentes en:**

- a) No deben existir conexiones con drenajes en el piso, válvulas de drenaje, juntas de expansión, albañales o cualquier otro tipo de apertura que pudieran permitir que los líquidos fluyan fuera del área protegida;
- b) Las paredes deben estar construidas con materiales no inflamables;
- c) Contar con ventilación natural o forzada. En los casos de ventilación forzada, debe tener una capacidad de recepción de por lo menos seis cambios de aire por hora;
- d) Estar cubiertas y protegidas de la intemperie y, en su caso, contar con ventilación suficiente para evitar acumulación de vapores peligrosos y con iluminación a prueba de explosión; y
- e) No rebasar la capacidad instalada del almacén.

**Condiciones para el almacenamiento en áreas abiertas, consistentes en:**

- a) Estar localizadas en sitios cuya altura sea, como mínimo, el resultado de aplicar un factor de seguridad de 1.5, al nivel de agua alcanzado en la mayor tormenta registrada en la zona;
- b) Los pisos deben ser lisos y de material impermeable en la zona donde se guarden los residuos, y de material antiderrapante en los pasillos. Estos deben ser resistentes a los residuos peligrosos almacenados;
- c) En los casos de áreas abiertas no techadas, no deberán almacenarse residuos peligrosos a granel, cuando éstos produzcan lixiviados; y
- d) En los casos de áreas no techadas, los residuos peligrosos deben estar cubiertos con algún material impermeable para evitar su dispersión por viento.

**Por parte de microgeneradores, consistentes en:**

- I. En recipientes identificados considerando las características de peligrosidad de los residuos, así como su incompatibilidad, previniendo fugas, derrames, emisiones, explosiones e incendios;
- II. En lugares que eviten la transferencia de contaminantes al ambiente y garantice la seguridad de las personas de tal manera que se prevengan fugas o derrames que puedan contaminar el suelo.

**16. RECOLECCIÓN Y TRANSPORTE EXTERNO**

Los residuos serán entregados a la empresa de recolección y transporte externo, especializadas para realizar estas actividades y autorizadas por la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), por la Secretaría de Comunicaciones y Transportes (SCT), así como por la autoridades universitarias correspondientes. La entrega de los residuos peligrosos por parte del generador, se acompañará por el manifiesto de recibo, transporte y recepción, mismo que será firmado por la empresa especializada como establecimiento generador de residuos peligrosos.

## **17. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS**

1. Ley General del Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente.
2. Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos.
3. Reglamento de la Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos.
4. Reglamento de la Ley general del Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente en Materia de Residuos Peligrosos.
5. Reglamento de la Ley general del Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente en Materia de Evaluación del Impacto Ambiental.
6. NOM-052-SEMARNAT-2005
7. NOM-053-SEMARNAT-1993
8. NOM-087-ECOL-SSA1-2002 Protección ambiental-Salud ambiental- Residuos peligrosos biológico infecciosos- clasificación y especificaciones de manejo.
9. Reglamento Federal de Seguridad, Higiene y Medio Ambiente de Trabajo
10. NOM-005-STPS-1993
11. NOM-118-STPS-2000
12. NOM-002-SCT2-1994
13. NOM-007-SCT2-1994
14. NOM-010-SCT-1994

### ANEXO 03

#### MEDIDAS DE SEGURIDAD Y SALUD OCUPACIONAL

1. Es imprescindible y obligatorio el uso de la bata blanca, de manga larga y abotonada completamente para todo trabajo en el laboratorio.
2. El uso de equipo de seguridad especificado (guantes, goggles, mascarilla) para la realización de prácticas en este laboratorio será obligatorio para estudiantes y maestros.
3. Queda estrictamente prohibido comer, beber y fumar dentro del laboratorio.
4. El uso de los equipos e instrumentos, que se utilicen durante la práctica debe reportarse en la bitácora de control y registro correspondiente.
5. Todos los equipos especialmente los aparatos delicados como microscopios, deben manejarse con cuidado evitando los golpes o el forzar sus mecanismos.
6. Todos los objetos personales deberán colocarse fuera del área de trabajo para evitar accidentes y contaminaciones.
7. Todos los estudiantes deberán mantener un comportamiento acorde con su calidad de estudiante universitario, que no ponga en riesgo la integridad física de los ahí presentes, la seguridad de las actividades que se realizan y el buen estado de materiales, reactivos, equipo e instrumentos del laboratorio.
8. Cualquier conducta inapropiada de los estudiantes dentro del laboratorio será sancionada de acuerdo al estatuto de los alumnos vigente.
9. Antes de iniciar la práctica los estudiantes deben sanitizar su mesa de trabajo utilizando un desinfectante.
10. En caso de algún percance o accidente se debe comunicar inmediatamente al maestro.
11. No devolver nunca a los frascos de origen los sobrantes de los productos utilizados, a fin de evitar contaminaciones, asegurarse de que queden bien cerrados.
12. Todo material contaminado después de inactivarse se depositará en los recipientes biológicos infecciosos según la Norma Oficial Mexicana. (NOM 087).
13. Durante y al finalizar la práctica los estudiantes deben mantener y dejar limpia sus áreas de trabajo.

14. Los riesgos en el laboratorio de Hematología, son escasos si se respetan las consignas de seguridad. Atendiendo la NOM-007 y NOM-087.
15. Es importante considerar que el material biológico que se maneja (sangre, plasma y suero) es potencialmente infectante, por eso se recomienda someter el material a la acción germicida enérgica.
16. Las precauciones que hay que tomar para evitar cualquier clase de contaminación corresponden más bien a una disciplina general de trabajo, que a unas reglas precisas como las que se mencionan a continuación:
  - a) Usar guantes desechables de cirugía para tomar cualquier muestra.
  - b) Desinfecte con alcohol la zona de venopunción.
  - c) Si se tiene heridas o alguna escoriación en la piel, debe cubrirla antes de empezar su labor en el laboratorio.
  - d) El sistema para toma de muestras por venopunción, por su bajo riesgo de contaminación, es el de tubos al vacío; la manipulación del espécimen es mínima.
  - e) En cuanto a peligro de contaminación se refiere, se evitará tocar con las manos la ropa, cara, cabello y objetos personales.
  - f) Se evitará estrechar la mano a posibles visitas, abrir grifos, abrir y cerrar puertas, tocar el teléfono y todo aquello que exija contacto manual ajeno al análisis cuando se están ejecutando fases delicadas de éste.
  - g) El lavado de manos será cuidadoso y frecuente. El secado se hará con toallas desechables.
  - h) Está prohibido el uso de guantes, después de procesar la muestra, sobre todo cuando se maneje el microscopio.
  - i) Cada estudiante debe llevar al laboratorio un recipiente de plástico o metal para depositar temporalmente los materiales de desecho que emplearon durante el procesamiento de la muestra.
  - j) No inserte nuevamente la funda de la aguja después de haber tomado muestra de sangre, SE AUMENTA EL RIESGO DE PUNCIÓN ACCIDENTAL; desempate la aguja del sistema de vacío o de la jeringa y colóquela dentro del recipiente destinado para objetos punzocortantes.

k) Transporte las muestras con sumo cuidado, manteniéndolas siempre tapadas. **NUNCA DEJE LAS MUESTRAS ABIERTAS.**

l) La ruptura de los tubos en la centrífuga, es el más frecuente de los accidentes en el laboratorio, para minimizar el riesgo de contaminación por salpicaduras se deben balancear los tubos en la centrífuga por peso y no por volumen.

m) En caso de ruptura de material de vidrio se procede inmediatamente a recoger de forma cuidadosa, adecuadamente protegidos, a depositar los restos en cubetas con antisépticos y/o depositarlos en recipientes para punzocortantes, lavando a continuación el lugar del accidente con desinfectante.

n) "NUNCA PIPETEE CON LA BOCA NINGUN ESPECIMEN DE LABORATORIO"; use micro pipetas con puntas desechables, peras succionadoras, ayudantes de pipetas o goteros de caucho.

ñ) Las muestras de sangre se desechan en el frasco rojo de RPBI.

o) Al terminar el trabajo lávese bien las manos con abundante agua y jabón, lo mismo cuando vaya a ingerir alimentos.

17. Evite contestar al teléfono, abrir puertas, neveras, congeladores u otros elementos de uso común en el laboratorio cuando esté manipulando suero, sangre u otro espécimen biológico. Planee adecuadamente su trabajo así como los reactivos y materiales que requiere durante los procedimientos analíticos.

18. Limpie adecuadamente la mesa de trabajo con solución al 3% de hipoclorito de sodio (cloralex, clorox, etc.) al empezar y al terminar su trabajo.

19. Descarte los materiales desechables tales como jeringas, puntas de micropipetas, cubetas plásticas, etc. en una solución al 3% de hipoclorito de sodio y destrúyalas por incineración. **NUNCA REUTILICE EL MATERIAL DESECHABLE QUE HA ESTADO EN CONTACTO CON FLUIDOS BIOLÓGICOS DE PACIENTES.** Elimine en solución de hipoclorito de sodio al 3% los sobrantes de suero, plasma, sangre y demás fluidos biológicos.

20. El material de laboratorio reutilizable de vidrio o plástico, se debe colocar en solución al 3% de hipoclorito de sodio mínimo por 2 horas antes de pasarlos a lavado.

21. Las agujas desechables que se han recogido en los recipientes destinados a ello, deben destruirse por incineración. **NUNCA ARROJE AGUJAS A LA BASURA.**

22. Terminado el trabajo, hay que procurar que no quede en la mesa ningún material más que el estrictamente necesario para facilitar la limpieza y desinfección diaria.

23. Evita llevar a la boca lapiceros, rotuladores, etiquetas etc., sobre todo si han estado en contacto con la mesa de trabajo.

24. La bata se utilizará exclusivamente para el trabajo en el laboratorio. Nunca se llevará puesta para salir a la calle.

**25. RECUERDE QUE LAS NORMAS NO EVITAN UN ACCIDENTE, LO PREVIENEN. LO UNICO QUE LO EVITA ES LA RESPONSABILIDAD EN EL TRABAJO.**

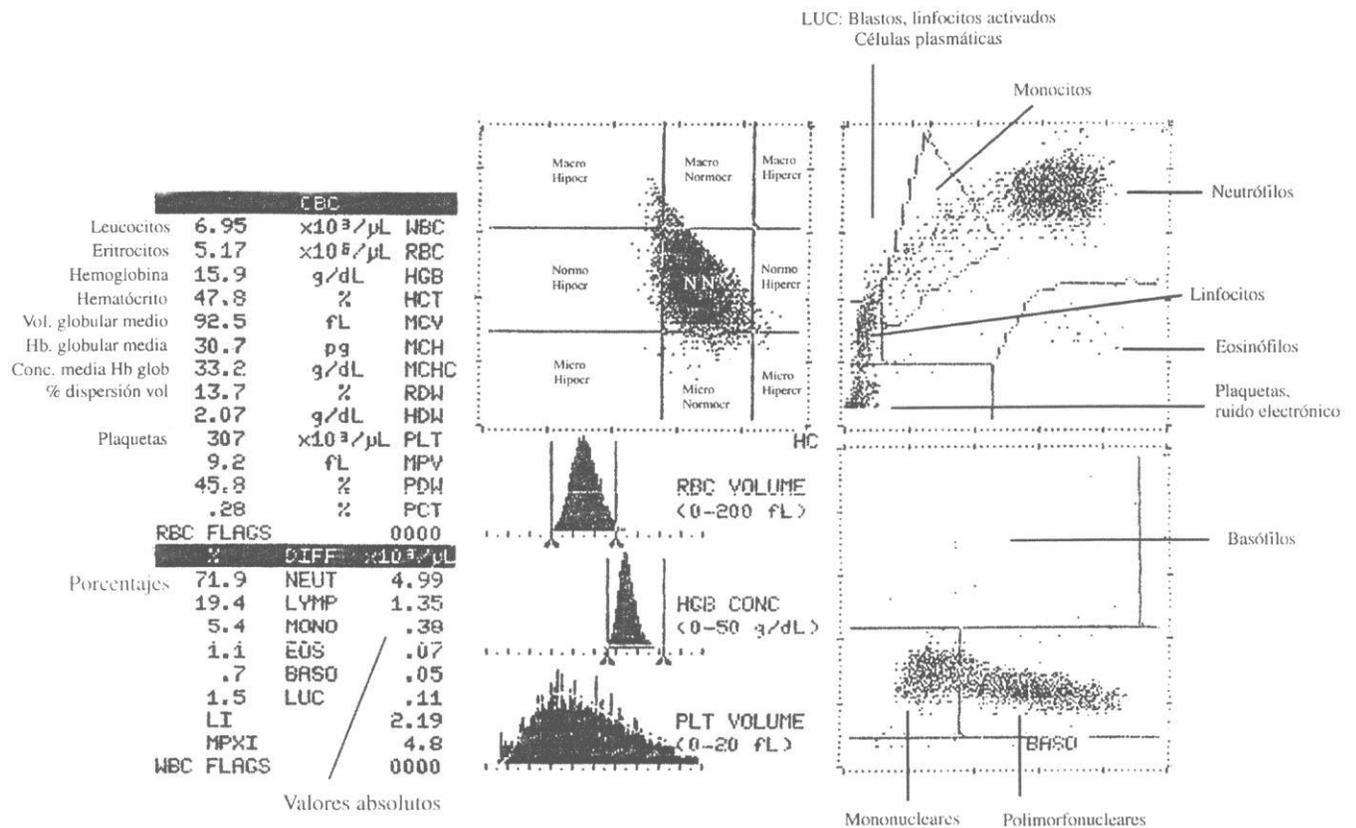
## ANEXO 04

### CASOS CLÍNICOS

En esta etapa de la enseñanza, los alumnos deben ser capaces no solo de hacer descripciones generales del material, sino de establecer diagnósticos precisos trabajando con ayuda de su material bibliográfico. Aquí los conocimientos teóricos se mezclan con la práctica para redondear el conocimiento de la patología hematológica.

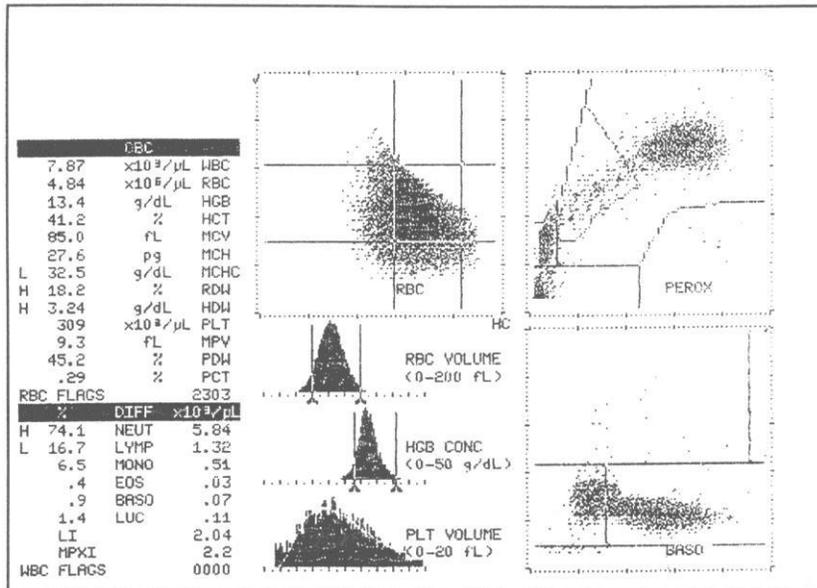
Para los casos en que resulta importante, se presentan histogramas realizados en el contador electrónico de células H\* 1<sup>TM</sup> de Bayer (antes Technicon), por ser este el equipo que proporciona los resultados más exactos y fáciles de interpretar, también se presentan algunas electroforesis de hemoglobina en acetato de celulosa, en algunos casos en donde se considera necesario.

## INTERPRETACION DEL HISTOGRAMA H\*1™ (BAYER)



Carrillo-Farga, Joaquín, (2000) “Manual de casos Clínicos II y II”. Diplomado Internacional Hematología en el Laboratorio Clínico”. Editorial Latinoamericana Cibercell. México,D.F.

## SERIE ROJA



### CASO 1

Paciente femenino de 45 años de edad con historia de ictericia mínima desde el nacimiento. En la exploración física se encontró, además de la ictericia, ligera protrusión del maxilar superior. La biometría hemática mostró el histograma que se muestra al lado. Reticulocitos 4%.

### DIAGNOSTICO:

### CASO 4

Paciente del sexo femenino de 45 años de edad con historia de hemorragia transvaginal frecuente por leiomiomas uterinos.

Siete meses antes de ser estudiada empezó a presentar palidez, astenia y disnea, que han ido aumentando.

En la exploración física se encontró una paciente muy pálida, con taquicardia.

La biometría hemática mostró los datos que se observan en el cuadro adyacente.

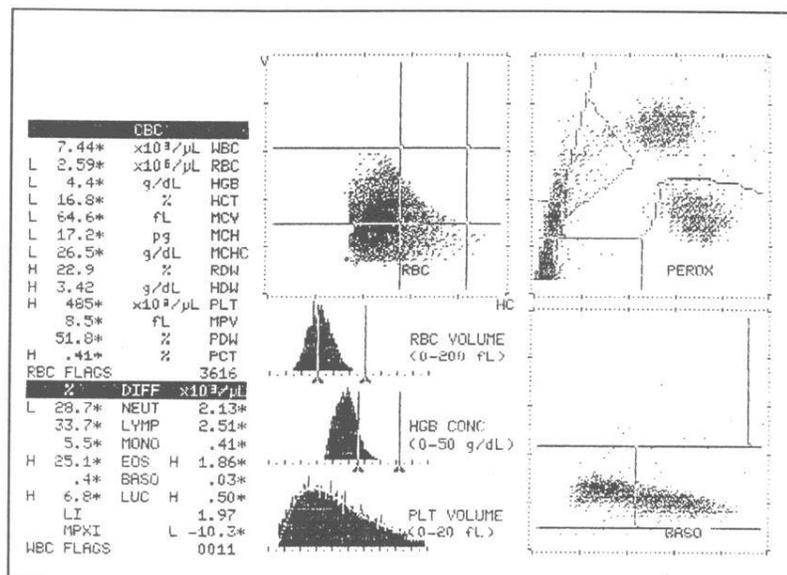
Reticulocitos: 1%

Hierro sérico: 18  $\mu\text{g}$  / dl

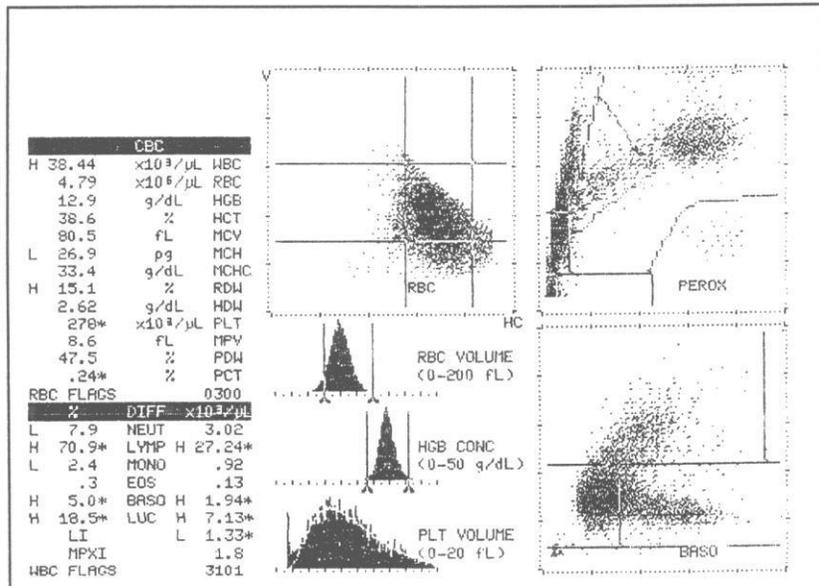
Cap. total de fijación: 568  $\mu\text{g}$  / dl

Índice de saturación 3%.

Ferritina 3.7  $\mu\text{g}$  / l



### DIAGNOSTICO:



### CASO 5

Paciente masculino de 6 años de edad que inició su padecimiento una semana antes de ser estudiado, con fiebre, dolor faríngeo y astenia notable, que le impidió asistir a la escuela. En la exploración física se encontró un escolar en buenas condiciones de nutrición, con fiebre, eritema faríngeo acentuado y crecimiento generalizado de los ganglios linfáticos, así como ligera hepatomegalia y esplenomegalia. La biometría hemática se muestra en el cuadro adyacente. Una prueba de Paul Bunell fue positiva.

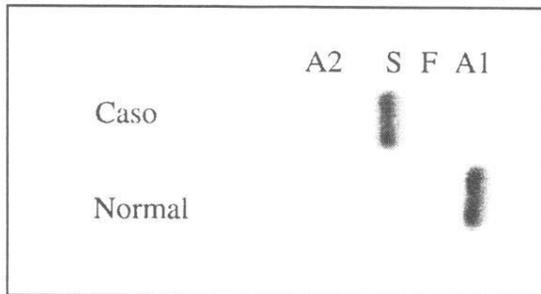
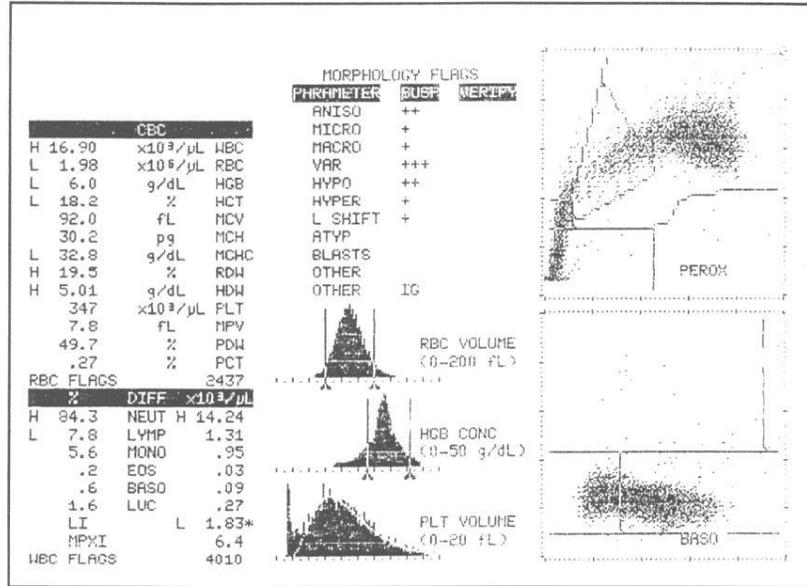
DIAGNOSTICO:

**CASO 7**

Paciente masculino de 15 años de edad con historia de palidez e ictericia desde los 8 meses de edad. Intermitentemente ha tenido varios cuadros de dolor en el hipocondrio izquierdo y en la articulación de la cadera derecha. En la exploración física se encontró un paciente delgado, con maxilar superior prominente y cráneo ligeramente abombado, además de palidez notable e ictericia moderada. El bazo no era palpable. Los datos de la biometría y de la electroforesis de hemoglobina se muestran en los dos cuadros adyacentes.

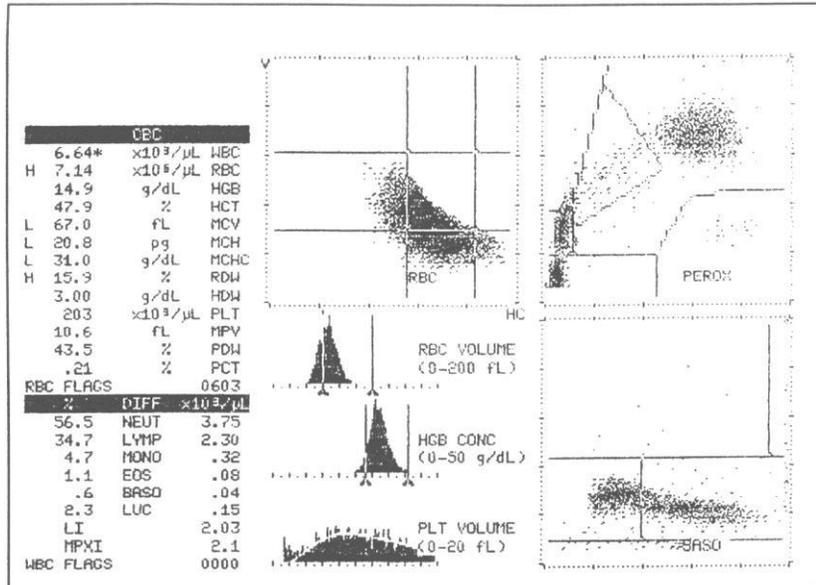
Reticulocitos: 14%

Bilirrubina indirecta: 2 mg / dl



**DIAGNOSTICO:**

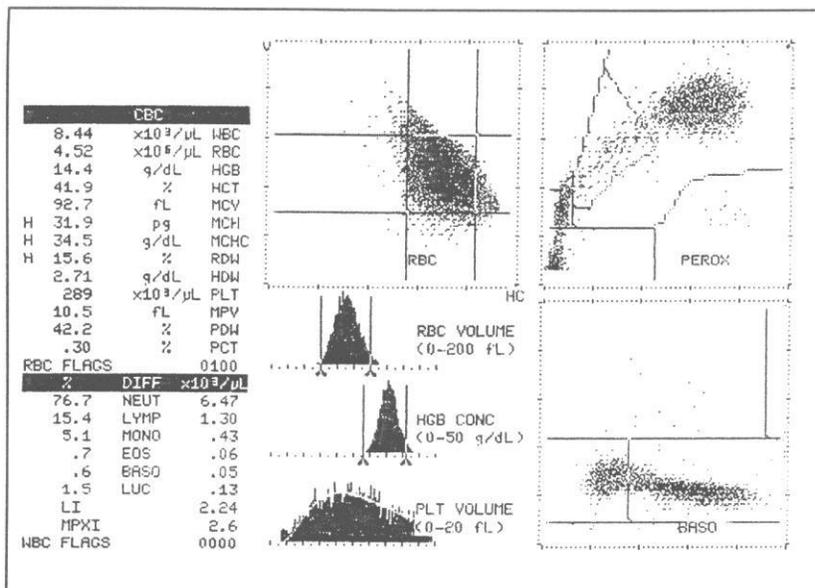
**ELECTROFORESIS DE HEMOGLOBINA  
ACETATO DE CELULOSA**



**CASO 10**

Paciente femenina de 34 años de edad con historia de mínima ictericia desde la infancia. diagnosticada como "hepatitis". En la exploración física se encontró una paciente en buen estado general y, fuera de mínima ictericia, asintomática y normal. La biometría hemática se muestra en el cuadro adyacente. Reticulocitos: 2%  
 Hemoglobina A2 por cromatografía en columna: 5.2% (Normal 2.5-3.5 %)  
 Hierro sérico normal.  
 Bilirrubina indirecta: 1.5 mg / dl  
 Pruebas de función hepática normales.

**DIAGNOSTICO:**



**CASO 13**

Paciente femenina de 32 años de edad con historia de ictericia variable desde el nacimiento. En la exploración física se encontró moderada esplenomegalia. La biometría hemática se muestra en el cuadro adyacente. Reticulocitos 8%  
 Bilirrubina indirecta: 2.5 mg / dl  
 Su padre y dos de sus cinco hermanos mostraron un cuadro similar.

**DIAGNOSTICO:**

**CASO 16**

Paciente de sexo masculino, con historia de alcoholismo crónico y cirrosis alcohólica en etapa terminal. Una semana antes de ser estudiado presentó palidez notable y aumento de ictericia. La biometría hemática mostró Hb: 5.2 g / dl; VGM: 94; CMHG: 33.5; reticulocitos: 15%

**DIAGNOSTICO:**

**CASO 19**

Paciente de sexo femenino de 4 años de edad, con historia de acentuada palidez e ictericia desde los seis meses de edad.

En la exploración física se encontró esplenomegalia muy notable, frente abombada y maxilar superior prominente, además de intensa palidez e ictericia.

La biometría hemática y la electroforesis de hemoglobina se muestran en los cuadros adyacentes.

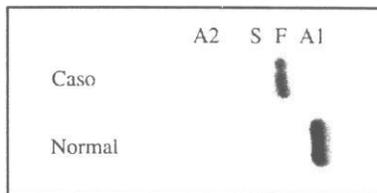
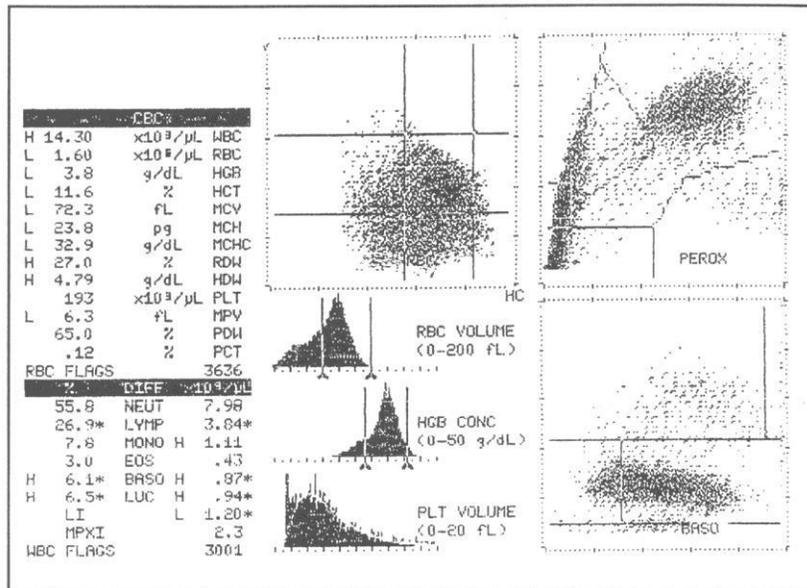
Bilirrubina indirecta: 4.5 mg / dl

Hemoglobina A2: 6.2 %

Hierro sérico: 340 ng / dl

CTF: 340 ng/ dl

IS: 100%



**DIAGNOSTICO:**

**CASO 22**

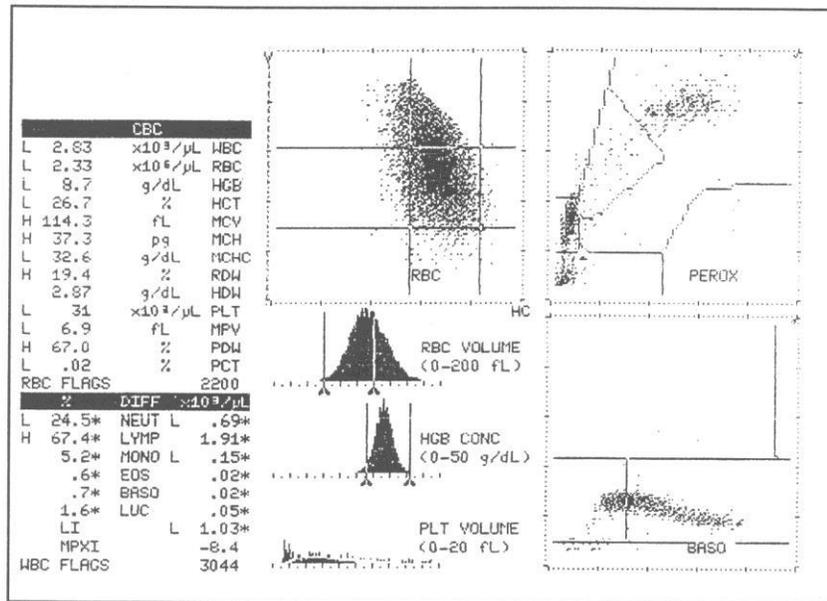
Paciente de sexo masculino de 32 años de edad con historia de síndrome de mala-absorción intestinal de un año de evolución.

Tres meses antes de ser estudiado empezó a presentar palidez y astenia.

La biometría mostró los datos que se observan en el cuadro adyacente.

Reticulocitos: 0.1 %

**DIAGNOSTICO:**



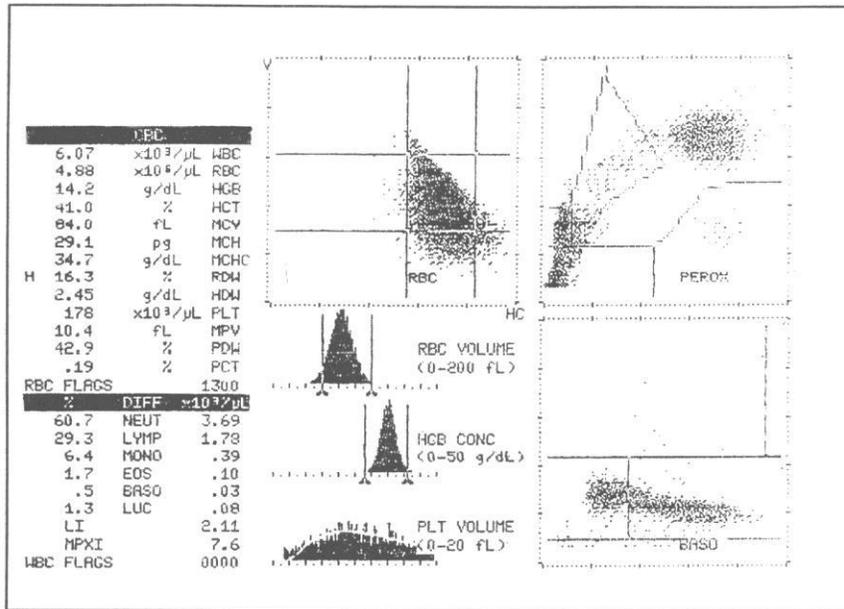
**CASO 24**

Paciente de sexo masculino, de 36 años de edad, natural de la selva de Chiapas y con antecedente de desnutrición grave. Un mes antes de ser estudiado desarrolló un cuadro febril con grave ataque al estado general.

En la exploración física se encontró un paciente en muy mal estado general, desnutrido, con hepato y esplenomegalia acentuadas.

La biometría hemática mostró pancitopenia severa. (Frotis de médula ósea).

**DIAGNOSTICO:**



**CASO 25**

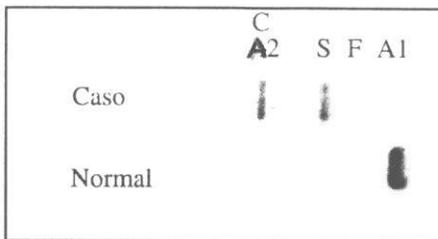
Paciente de sexo femenino de 34 años de edad, con historia de ictericia fluctuante desde el año de edad y ocasionales crisis dolorosas en las articulaciones de la cadera. En una ocasión presentó hematuria no habiéndose determinado la causa.

En la exploración física se encontró ictericia conjuntival mínima y ligera protrusión del maxilar superior.

La biometría hemática y electroforesis de hemoglobina se muestran en los cuadros adyacentes.

Reticulocitos: 6 %

Inducción de drepanocitos: +



**DIAGNOSTICO:**

**CASO 28**

Paciente de sexo femenino de 63 años de edad, de origen inglés, con historia de gastritis de 8 años de evolución. Un año antes de ser estudiada empezó a presentar palidez progresiva y en el último mes presentó ligera ictericia. En la biometría hemática se encontró Hb: 4.3 g / dl; VGM: 145; CMHG: 33.1; reticulocitos: 0.2 %; leucocitos: 3,400; plaquetas: 80,000 (Frotis de médula ósea)

**DIAGNOSTICO:**

**CASO 46**

Paciente masculino de 34 años de edad, con historia de mínima ictericia desde el primer año de vida.

En la exploración física se corroboró la ictericia.

La biometría hemática mostró los datos que se observan en el cuadro adyacente.

Reticulocitos: 2.5%

Bilirrubina indirecta: 2.3 mg

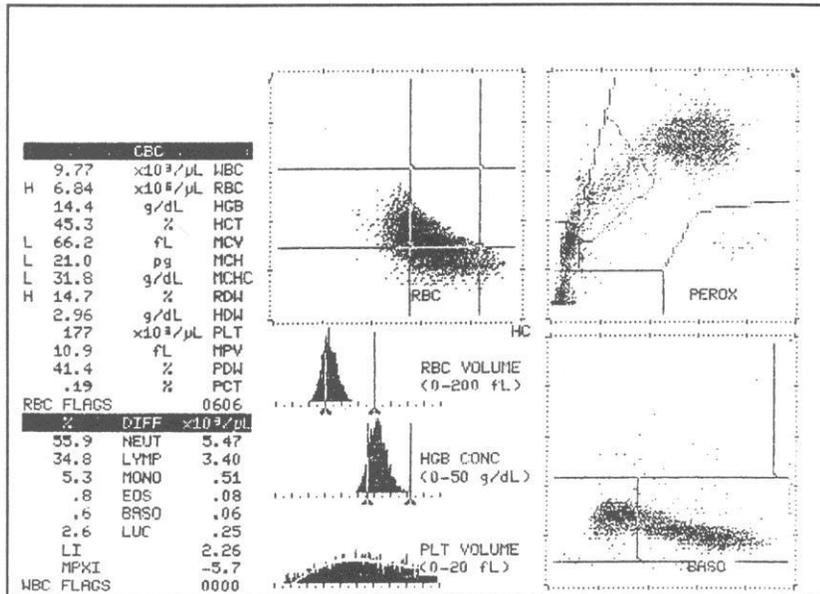
Bilirrubina directa normal.

Electroforesis de hemoglobina normal.

Hemoglobina A2 normal.

Hemoglobina fetal normal.

**DIAGNÓSTICO:**



**CASO 49**

Paciente de sexo femenino de 54 años de edad con historia de mínima ictericia intermitente desde la niñez.

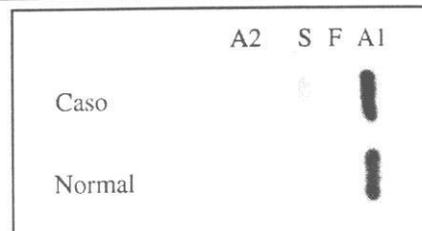
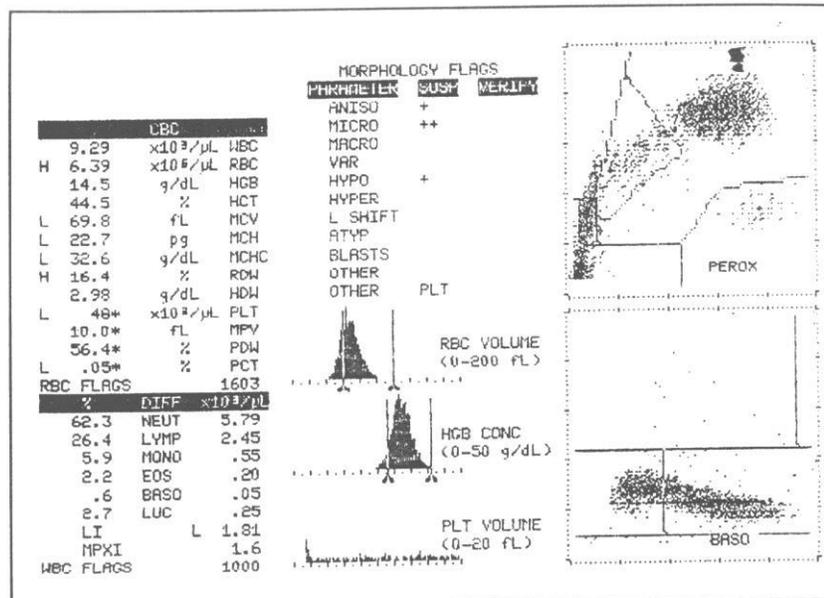
En la exploración física se encontró una paciente sin alteraciones visibles.

La biometría hemática mostró los datos que se observan en el cuadro adyacente.

La electroforesis de hemoglobina también se muestra al lado.

La inducción de drepanocitos fue negativa.

**DIAGNÓSTICO:**



**CASO 61**

Paciente de sexo femenino de 32 años de edad con historia de 6 meses de evolución con dolores articulares. Hace 1 mes se agregó palidez e ictericia.

En la exploración física se encontró una paciente en buenas condiciones generales, pálida y con moderada ictericia.

La biometría hemática mostró los cambios que se observan en el cuadro adyacente.

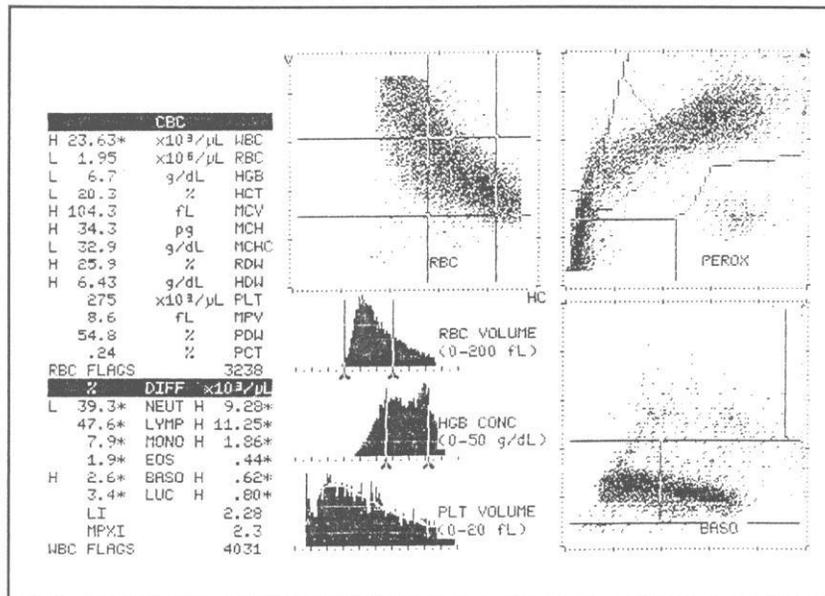
Reticulocitos: 35%

Prueba de Coombs positiva.

Bilirrubina indirecta: 3 mg

Anticuerpos anti DNA y antinucleares positivos.

**DIAGNÓSTICO:**



**CASO 67**

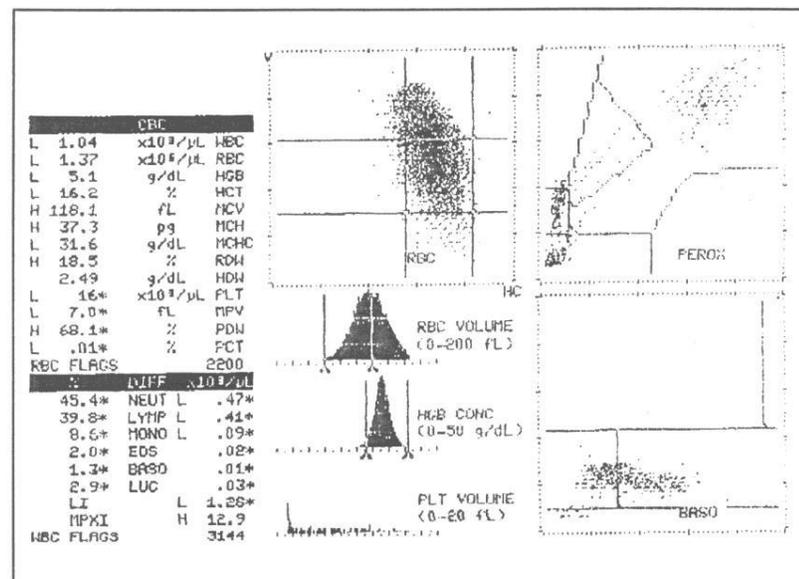
Paciente masculino de 31 años de edad con historia de palidez acentuada, astenia, petequias, sangrado nasal y gingival desde los 8 años.

En la exploración física se encontró un paciente de baja estatura, delgado, con zonas de hiperpigmentación cutánea y dedos pulgares hipoplásicos.

Los datos de la biometría hemática se observan en el cuadro adyacente.

Corte histológico de médula ósea y cariotipo incubado con mitomicina.

**DIAGNÓSTICO:**



**CASO 68**

Paciente de sexo femenino de 16 años de edad con historia de dolor y tumefacción en articulaciones de las manos, así como lesiones eritematosas en la cara después de exposición al sol, de dos meses de evolución.

En la exploración física se corroboraron estos datos.

La biometría hemática mostró mínima anemia (11.9 g/ dl) normocítica normocrómica, leucocitos totales normales con moderado aumento de linfocitos granulares, y plaquetas de 120.000.

Entre otras pruebas se realizó un estudio para células LE que corresponde a la laminilla mostrada.

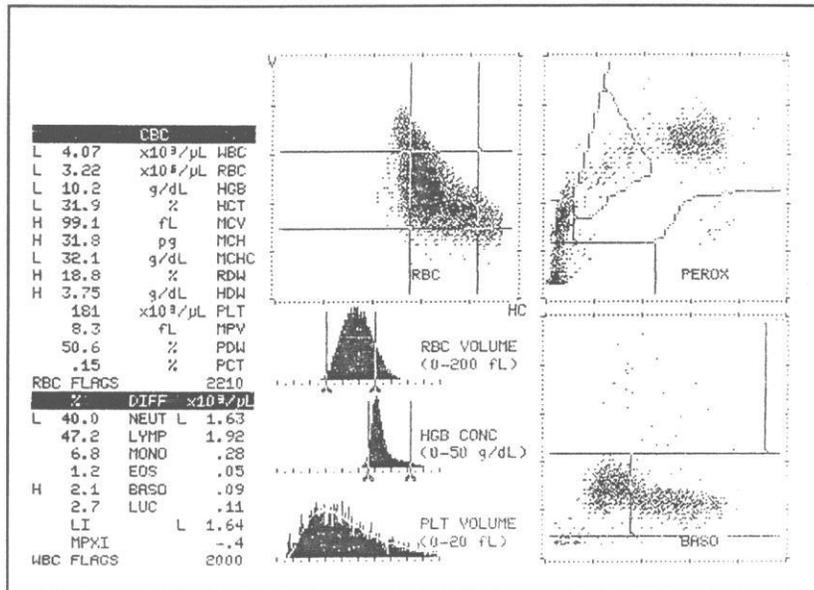
**DIAGNÓSTICO:**

**CASO 79**

Paciente de sexo masculino de 19 años de edad quien 12 horas después de haber comido una “gran cantidad” de tacos al pastor, desarrolló un cuadro de fiebre, dolor muscular, palidez y orina oscura.

Inmediatamente se le realizó una biometría hemática cuyos datos se observan en el cuadro adyacente.

**DIAGNÓSTICO:**



**CASO 83**

Paciente de sexo masculino de 38 años de edad con un cuadro de 5 meses de evolución caracterizado por palidez progresiva y orina de color café oscuro por las mañanas. El paciente desarrolló, un mes antes de ser estudiado, un cuadro diagnosticado como trombosis de las venas suprahepáticas.

En la exploración física se encontró un paciente pálido y con hepatomegalia secundaria a la trombosis venosa descrita.

En la biometría hemática se encontró hemoglobina de 9.6 g / dl, VGM de 68, HGM de 22, CMHG de 30.2, reticulocitos de 7%, leucocitos y plaquetas normales. Hierro sérico 22  $\mu\text{g}$  con un índice de saturación de 9%. Una prueba de Ham (hemólisis ácida) fue positiva.

Frotis de sedimento urinario teñido con la técnica de Perls.

**DIAGNÓSTICO:**

Carrillo-Farga, Joaquín, (2000) “Manual de casos Clínicos II y II”. Diplomado Internacional Hematología en el Laboratorio Clínico”. Editorial Latinoamericana CiberCell. México,D.F.

## SERIE BLANCA

### CASO 3

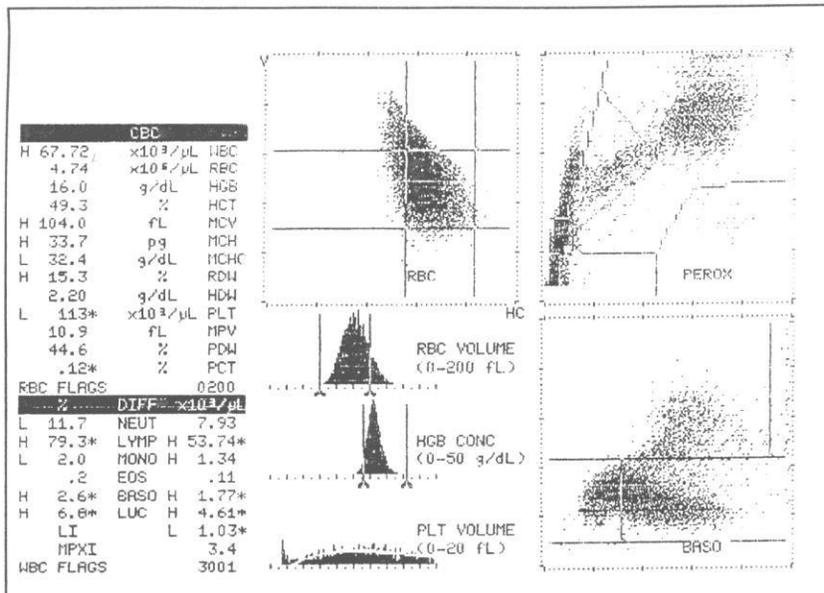
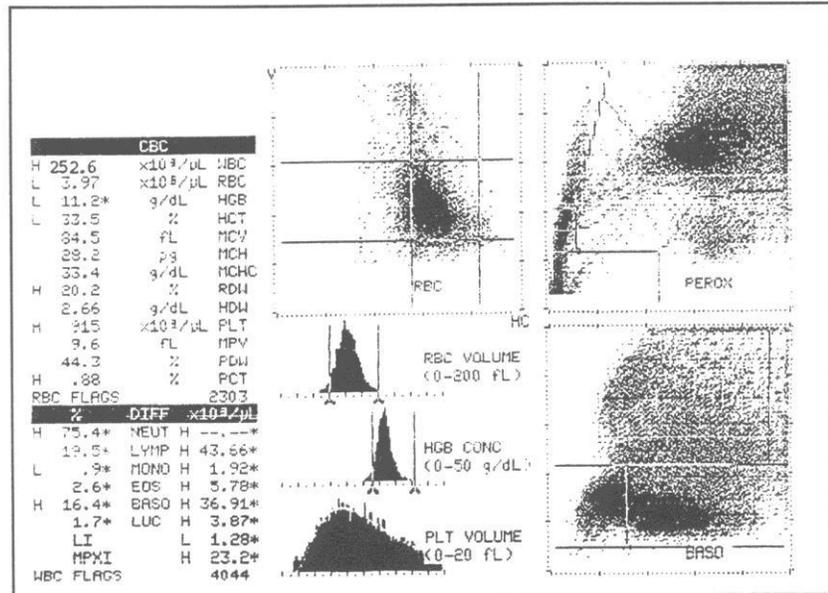
Paciente masculino de 46 años de edad con historia de dos meses de evolución con pérdida de 5 Kg de peso, fiebre, sudoración nocturna y dolor óseo.

En la exploración física se encontró moderada hepatomegalia y esplenomegalia importante.

La biometría hemática mostró los datos que se observan en el cuadro adyacente.

Reticulocitos 1.2%

### DIAGNOSTICO:



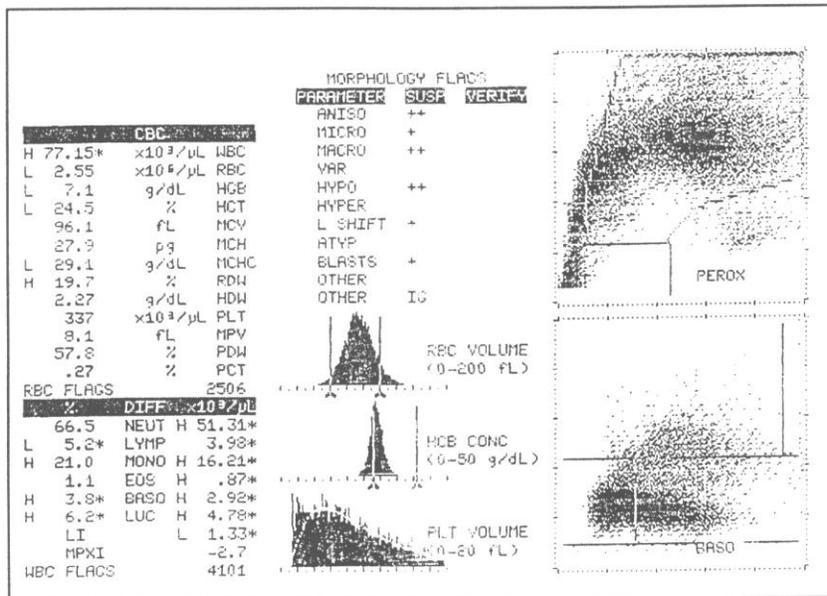
### CASO 6

Paciente masculino de 74 años de edad con historia de crecimiento moderado de los ganglios linfáticos del cuello, de un año de evolución.

En la exploración física se encontró crecimiento generalizado, de mínimo a moderado, de los ganglios linfáticos, así como esplenomegalia mínima.

Los datos de la biometría hemática se muestran en el cuadro adyacente.

### DIAGNOSTICO:



**CASO 9**

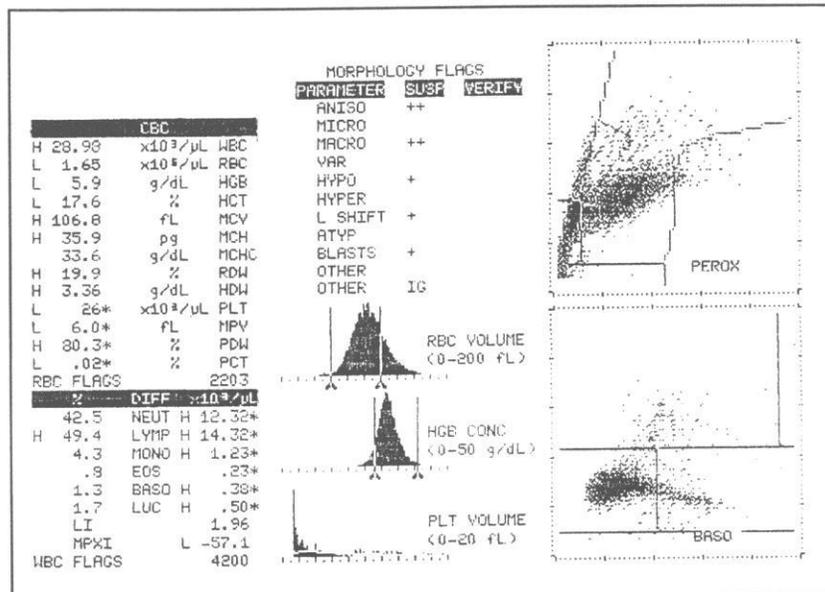
Paciente masculino de 68 años de edad con historia de palidez, astenia y fiebre vespertina de 4 meses de evolución. En la exploración física se encontró un paciente en buenas condiciones generales, pálido y con moderada esplenomegalia. Varios estudios dirigidos a estudiar procesos infecciosos (tuberculosis, brucelosis y salmonellosis) fueron negativos. La biometría hemática mostró los datos que se observan en el cuadro adyacente.

**DIAGNOSTICO:**

**CASO 30**

Paciente de sexo masculino de 28 años de edad con historia de tres semanas de evolución con fiebre, mal estado general, palidez acentuada progresiva y hemorragia nasal y gingival. En la exploración física se encontraron múltiples petequias cutáneas y ligera hepato y esplenomegalia. La biometría hemática se muestra en el cuadro adyacente. Reticulocitos: 0.3 %

**DIAGNOSTICO:**



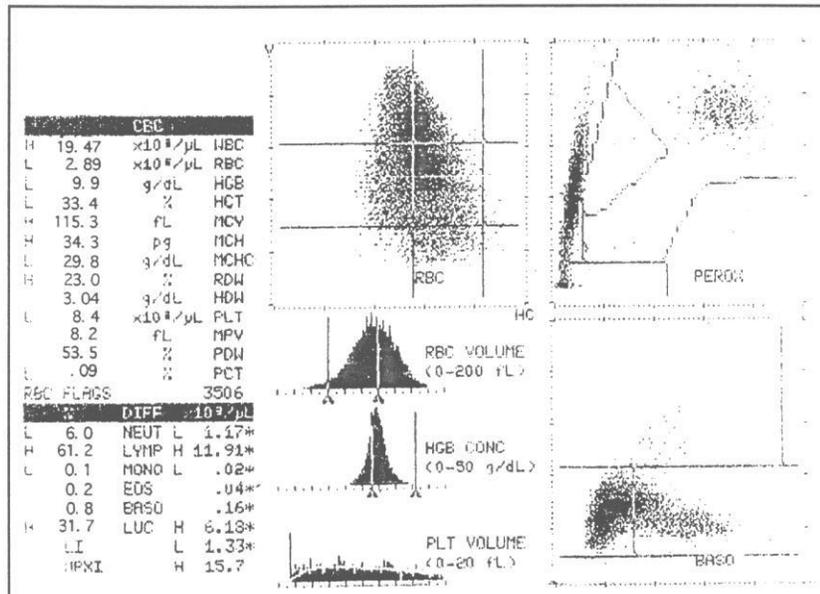
**CASO 33**

Paciente de sexo masculino de 36 años de edad, con una historia de 4 meses de evolución con palidez y astenia.

En la exploración física se encontró un paciente en buen estado general, pálido y con ligera esplenomegalia.

Los datos de la biometría hemática se muestran en el cuadro adyacente

**DIAGNOSTICO:**



**CASO 36**

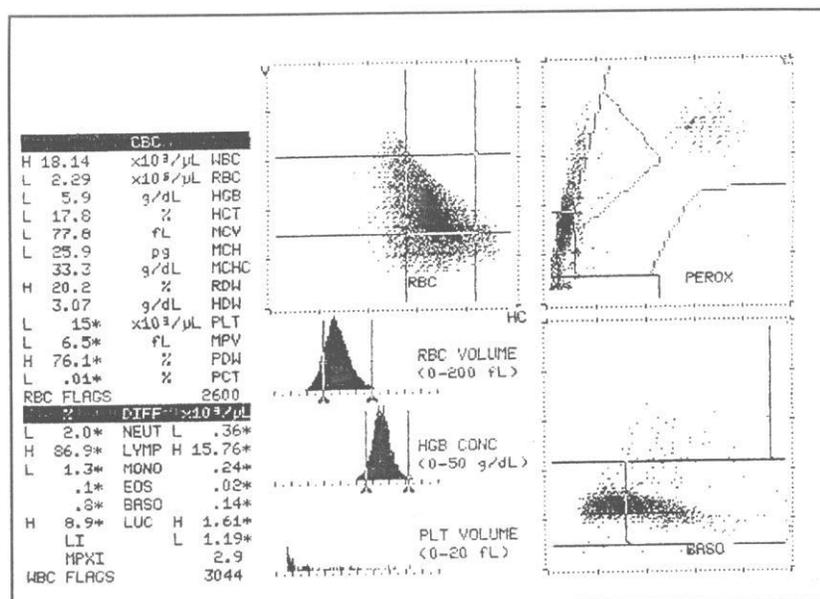
Paciente de sexo femenino de 5 años de edad con una historia de palidez progresiva y sangrado nasal frecuente de 3 semanas de evolución.

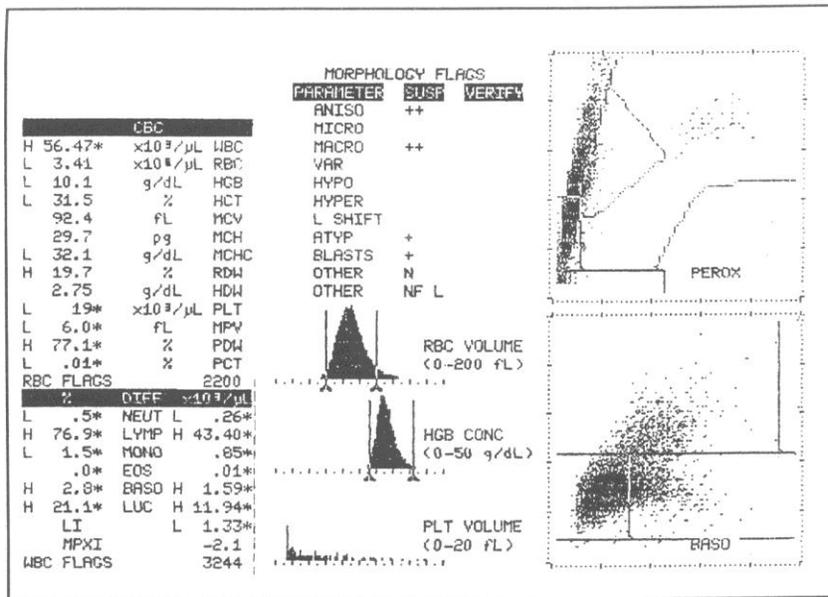
En la exploración física se encontró una paciente febril, en malas condiciones generales, pálida y con petequias cutáneas generalizadas.

Los datos de la biometría hemática se muestran en el cuadro adyacente.

(Frotis de médula ósea).

**DIAGNOSTICO:**





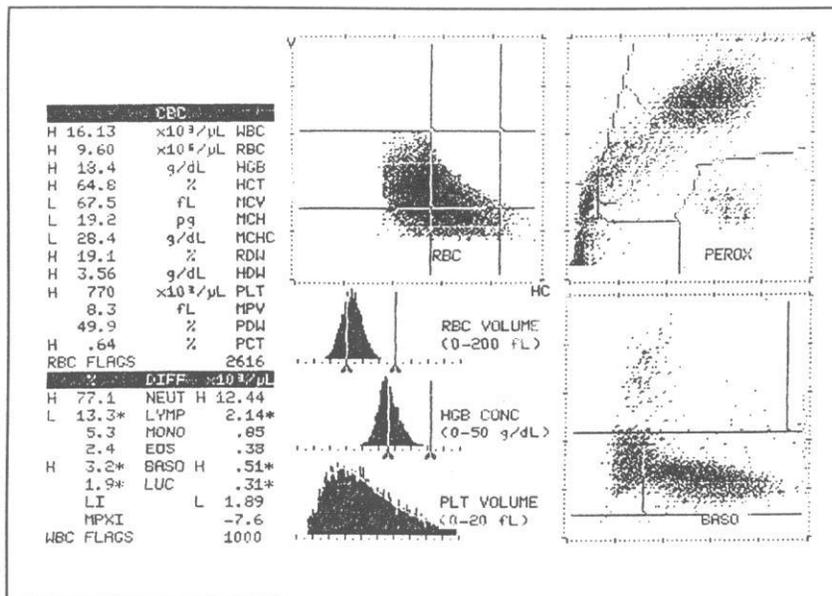
**CASO 39**

Paciente de sexo masculino de 10 años de edad, con una historia de astenia, palidez y disnea de tres semanas de evolución. En una radiografía lateral del tórax se encontró una gran masa en la región del timo.

La biometría hemática mostró los datos que se observan en el cuadro adyacente.

Reticulocitos: 0.4 %

**DIAGNOSTICO:**



**CASO 81**

Paciente de sexo masculino de 71 años de edad con historia de "policitemia" tratada con sangrías. Los estudios para evaluar patología pulmonar, cardiovascular o tumoral fueron negativos. El paciente no era obeso y no fumaba.

Los datos de la biometría hemática se muestran en el cuadro adyacente.

**DIAGNÓSTICO:**

Carrillo-Farga, Joaquín, (2000) "Manual de casos Clínicos II y II". Diplomado Internacional Hematología en el Laboratorio Clínico". Editorial Latinoamericana Cibercell. México,D.F.

## HEMOSTASIA

### CASO 26

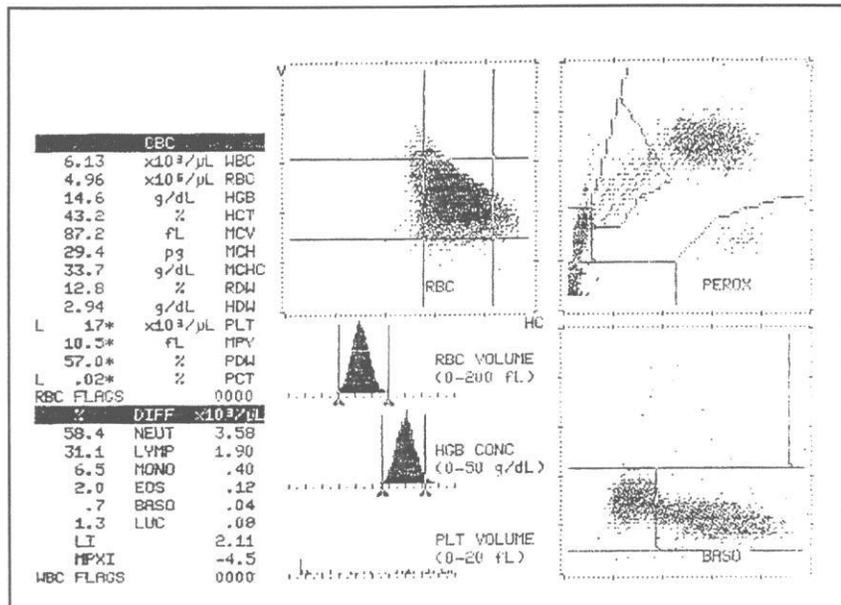
Paciente de sexo femenino de 26 años de edad con historia de tres meses de evolución con dolor articular, sangrado nasal ocasional y petequias cutáneas.

En la exploración física se encontró una paciente en buen estado general con algunas petequias en el tronco y los miembros inferiores.

La biometría hemática mostró los datos que se observan en el cuadro adjacente.

Células LE +

(Frotis de sangre y médula ósea)



DIAGNOSTICO:

### CASO 43

Paciente de sexo femenino con un cuadro clínico de 2 semanas de evolución caracterizado por palidez, equimosis, petequias y cambios mentales importantes, habiendo llegado a presentar un cuadro psicótico.

En la exploración física se encontró una paciente pálida, incoherente, con numerosas petequias y equimosis.

La biometría hemática mostró anemia (8.2 g / dl) con VGM de 65 y CMHG de 34.1 Reticulocitos: 17%

DIAGNÓSTICO:

Carrillo-Farga, Joaquín, (2000) “Manual de casos Clínicos II y II”. Diplomado Internacional Hematología en el Laboratorio Clínico”. Editorial Latinoamericana CiberCell. México,D.F

## ANEXO 05

### PRÁCTICAS COMPLEMENTARIAS

FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

LABORATORIO DE HEMATOLOGÍA

“INDUCCIÓN DE DREPANOCITOS”

#### OBJETIVO(S):

Que el alumno aprenda a realizar correctamente la prueba de inducción de drepanocitos e identifique la utilidad diagnóstica de dicha inducción.

#### FUNDAMENTO:

Cuando la tensión parcial de oxígeno es baja, los eritrocitos que contienen hemoglobina S adoptan la forma de hoz, falciforme o de drepanocito por formación de polímeros de desoxihemoglobina, que ocasionan la deformación intensa de los eritrocitos. El fenómeno es reversible y depende de la tensión parcial de oxígeno: pobre oxigenación = drepanocitos; oxigenación normal = eritrocitos normales. En el laboratorio podemos inducir la formación de drepanocitos mezclando la sangre problema con un agente reductor como el metabisulfito de sodio y sellando la preparación para impedir la entrada de oxígeno.

#### GENERALIDADES:

Cuando la tensión parcial de oxígeno es baja, los eritrocitos que contienen hemoglobina S adoptan la forma de haz, falciforme o drepanocito por formación de polímeros de desoxihemoglobina, que ocasionan la deformación intensa de los eritrocitos. El fenómeno es reversible y depende de la tensión parcial de oxígeno: pobre oxigenación= drepanocitos, oxigenación normal= eritrocitos normales. En el laboratorio podemos inducir la formación de drepanocitos mezclando la sangre problema con un agente reductor como el metabisulfito de Na y sellando la preparación para impedir la entrada de oxígeno.

Cuando los hematíes se exponen a poderosos agentes reductores, se observa tendencia a constituir células en media luna, es decir, en forma de haz o más corrientemente, espinas y filamentos irregulares con aspecto de hoja de acebo. Se han observado drepanocitos en frotis vaginales de mujeres con anemia falciforme. El fenómeno drepanocítico refleja la cristalización de la hemoglobina en esa forma característica. Los drepanocitos aparecerán al cabo de pocas horas en el caso de la anemia falciforme y tardarán algo más de tiempo en el rasgo falciforme hereditario. Se han observado reacciones drepanocíticas fiables cuando la concentración de hemoglobina sanguínea es muy baja o existe policitemia.

*ANEMIA DREPANOCITICA:* se caracteriza por la presencia de eritrocitos falciformes en la sangre determinados por un gen Hb S transmitido en forma homocigota. Los eritrocitos contienen hasta un 80-100% de Hb S, el resto es HbF, en tanto que la HbA falta por completo. La mayoría de los pacientes sufren una anemia intensa, con hepatoesplenomegalia y tendencia a la trombosis. Por lo general, la anemia drepanocítica se descubre en la infancia y las personas afectadas de ella rara vez viven más allá de la juventud. La hemoglobinopatía drepanocítica se da principalmente en negros o personas de antecedentes negros. La sintomatología varía ampliamente como cabe esperar de una enfermedad que cursa con hemólisis, anemia y oclusión vascular. De vez en cuando se presentan episodios agudos caracterizados por fiebre, dolor abdominal, o articular,

leucocitosis e ictericia. En algunas ocasiones la neumonía forma parte de la crisis. La osteomielitis, la meningitis neumocócica y la septicemia son complicaciones frecuentes. En la infancia se observa esplenomegalia, pero en años posteriores a ella el bazo va disminuyendo de tamaño. Hay presencia de hematuria y la anemia suele ser grave. El lab. Nacional de estandarización de hemoglobinopatías ha recomendado que se emplee la electroforesis en acetato de celulosa como procedimiento básico de todos los programas de orientación y detección de la anemia falciforme. Cuando se aprecia más HbS que HbA<sub>1</sub>, se debe sospechar una interacción con la talasemia.

Por lo general, la anemia es grave y esencialmente normocrómica y normocítica. Un frotis de sangre muestra anisocitosis, poiquilocitosis, células blanco, policromasia, y a menudo eritrocitos nucleados. Pueden observarse algunos drepanocitos, pero se hallan con mayor facilidad después de incubar una gota de sangre con algún agente reductor. Si se examina al microscopio alguna preparación húmeda de sangre reducida se descubren los drepanocitos. Puede haber leucocitosis trombocitosis moderada. La médula ósea muestra hiperplasia eritroide. La electroforesis de la hemoglobina muestra que no hay HbA; predomina la HbS con una cantidad variable de HbF. El diagnóstico clínico puede confirmarse por la prueba de los drepanocitos y por electroforesis de la hemoglobina. Esta última ayuda a distinguir las anomalías mixtas. Los estudios familiares también ayudan a aclarar el diagnóstico diferencial entre un estado homocigoto y un doble heterocigoto. No hay tratamiento específico alguno. La transfusión puede beneficiar temporalmente y los síntomas deben tratarse según aparezcan. Debe tenerse cuidado de evitar cualquier estado en el cual pueda aparecer anoxia, en particular la aviación, el buceo u otros. Se han ensayado numerosos métodos para prevenir las crisis de drepanocitemia con grado variable de éxito, según se ha informado. Estos incluyen conversión de la hemoglobina corporal a metahemoglobina, disminución tentativa de la tonicidad intracelular mediante transfusión de agua, administración de una gran cantidad de álcalis y separación tentativa de los enlaces hidrofóbicos mediante transfusiones por zonas.

Otros padecimientos por drepanocitosis: rasgo drepanocítico, enfermedad drepanocítica con hemoglobina C, talasemia-drepanocitosis.

Rasgo drepanocítico: la drepanocitemia es la hemoglobinopatía más frecuente en estados unidos. Este proceso heterocigoto se encuentra aproximadamente el 9% de individuos americanos de raza negra. En circunstancias normales no hay signos clínicos de enfermedad ni anomalías hematológicas. Sin embargo una acidosis o una hipoxia producidas por vuelos aéreos, infección respiratoria, anestesia o insuficiencia cardiaca congestiva pueden causar una crisis drepanocítica y complicaciones vasculares con infartos viscerales, incluyendo hematuria. En adultos con este rasgo hereditario se observa incapacidad para concentrar la orina. Esta enfermedad protege a los niños de los efectos letales del paludismo falcíparo, lo que puede explicar la mayor distribución de la HbS en África central. Las extensiones teñidas son normales, excepto acaso algunas células diana. La formación de células falciformes es positiva y casi todos los hematíes se convierten en falciformes finalmente. La prueba de solubilidad es positiva.

Enfermedad de la hemoglobina C: la enfermedad homocigótica de la hemoglobina C es una anemia hemolítica leve con esplenomegalia, que a menudo es asintomática, pero a veces

ocasiona ictericia y molestias abdominales. En estados unidos, 0.02% de la población de raza negra tiene enfermedad de HbC. En la sangre se observa una anemia leve normocrómica y normocítica con una mezcla de microcitos y esferocitos, un aumento mínimo de los reticulocitos y numerosas células diana. La fragilidad osmótica es difásica, con aumento y disminución. En la extensión teñida pueden apreciarse cristales hexagonales o en forma de bastocitos en los hematíes, sobre todo después de una esplenotomía o si la extensión se ha secado despacio. El VCM es normal o está disminuido y la CHCM es normal o está incrementada. La reticulocitos es menor de lo esperado, probablemente a causa de la desviación a la derecha de la curva de disociación de la oxihemoglobina.

Talasemia-drepanocitosis: este trastorno se parece clínicamente a la anemia drepanocítica. Los estudios de laboratorio muestran células blanco en el frotis de sangre, y en la electroforesis generalmente se encuentran HbA, al igual que HbS y HbF.

Se cree que las hemoglobinas S, C, D y E son polimorfismos, ya que su frecuencia es superior a la que podría pronosticarse por simple mutación. Existen en forma homocigótica y heterocigótica y afectan la cadena  $\beta$ .

#### EQUIPO:

Microscopio.

#### MATERIAL:

- a) Biológico: Sangre obtenida con EDTA.
- b) De laboratorio: Portaobjetos  
Cubreobjetos  
Pipetas Pasteur  
Gradilla  
Palillos de madera  
Aceite de inmersión  
Metabisulfito de sodio al 2% recién preparado  
Parafina fundida  
Hisopos de algodón

#### TÉCNICA:

1. Poner una gota de metabisulfito de sodio al 2%, recientemente preparado, en un portaobjetos.
2. Agregar una gota de sangre problema y mezclar con un palillo de madera.
3. Tomar una gota pequeña de la mezcla y colocarla en el centro de un portaobjetos.
4. Cubrir la gota con un cubreobjetos.
5. Con la parafina fundida y usando un hisopo a manera de pincel, sellar cuidadosamente el contorno de un cubreobjeto. Observando por el reverso del portaobjetos, verificar que no queden orificios por donde pudiera entrar oxígeno.
6. Dejar en reposo.
7. Observar al microscopio a los 30 y 60 minutos, y posteriormente, a las 24 horas.

**INTERVALOS DE REFERENCIA:**

Inducción de drepanocitos: Negativa.

**NOTA:**

La positividad de la prueba confirma la presencia de hemoglobina S ya que sólo los eritrocitos que la contengan adoptarán la forma semilunar. La cantidad de drepanocitos observados y el tiempo en el que se formen será proporcional a la cantidad de hemoglobina S presente. En los homocigotos y en la mayoría de los heterocigotos, la positividad se manifiesta a la hora; sin embargo, no se debe considerar negativa una prueba hasta las 24 horas. En caso de positividad, se recomienda practicar una electroforesis de hemoglobinas.

**FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA  
LABORATORIO DE HEMATOLOGÍA**

**“DETECCIÓN DE DEFICIENCIA DE GLUCOSA 6-FOSFATO DESHIDROGENASA”**

**OBJETIVO(S):**

Que el alumno realice la prueba para detectar la deficiencia de glucosa 6- fosfato deshidrogenasa preparando controles normales y positivos, y los resultados compararlos con alguna patología en donde exista la deficiencia de dicha enzima.

**FUNDAMENTO.**

Cuando existe deficiencia de la enzima glucosa 6- fosfato deshidrogenasa, se presentan cuadros de hemólisis. En general ésta enzima, con función disminuida, es suficiente para contender con las cantidades de oxidantes presentes de manera basal en el organismo.

Sin embargo, cuando la cantidad de oxidantes aumenta, por ingestión de medicamentos o alimentos, o bien por la producción de oxidantes endógenos en el curso de infecciones, el mecanismo antioxidante puede ser insuficiente.

En el laboratorio la enzima deberá ser medida antes o después de las crisis hemolíticas, porque si se miden en el momento de la crisis, habrá una mayor cantidad por el número de reticulocitos que se están sintetizando.

Para que se lleve a cabo el cambio de estado del ión férrico a ferroso, se requiere de una oxidación que en éste caso la solución de nitrito de sodio-dextrosa la lleva a cabo y el sulfato de azul de nilo es un donador electrónica artificial que verifica si la glucosa 6- fosfato deshidrogenasa reduce al NAD para producir NADH.

**GENERALIDADES:**

Aproximadamente el 5% de la glucosa celular ingresa a la vía oxidativa HMP, un sistema auxiliar para producir sustancias reductoras. Esta vía produce NADPH y glutatión. El glutatión reducido protege a la célula contra cualquier lesión oxidante permanente. Los oxidantes dentro de la célula oxidan a los grupos sulfhidrilo de la Hb, a menos que los oxidantes sean reducidos por el GSH. Existe un proceso de reducción que oxida al glutatión, el cual a su vez es reducido nuevamente a GSH mediante valores adecuados de NADPH. La falla para mantener el poder reductivo a través de valores GSH o NADPH produce oxidación de los grupos sulfhidrilo de la hemoglobina seguido por una desnaturalización y precipitación de la Hb en forma de cuerpos de Heinz. Estos se adhieren a la membrana celular y son removidos de la célula junto con un fragmento de la membrana por los macrofagos en el bazo. En caso de que grandes porciones de esta membrana sean dañadas de esta manera, la

célula completa suele ser eliminadas. El glutatión reducido también es responsable de mantener los grupos sulfhidrilo de la membrana, lo cual resulta en membranas celulares débiles. La disminución celular de ATP logra presentarse debido al aumento en el consumo de energía por la bomba de cationes.

Los cuerpos de Heinz no se tiñen con los colorantes de Romanowsky, pero es posible observarlo con tinciones supravitales o con microscopio de fase en la célula viva. Se presentan como masas redondas de 2 a 3  $\mu$ m inmediatamente por debajo de la membrana celular, o fija a ésta. Los cuerpos de Heinz están constituidos por HB desnaturalizada

agregada. Se presentan en enzimopatías, toxinas o fármacos que afectan a la Hb, trastornos de Hb inestables y después de esplenectomía. Los cuerpos de Heinz aparecen en las primeras etapas de la hemólisis farmacoinducida en personas con deficiencias de glucosa 6- fosfato deshidrogenasa.

Las personas con deficiencia de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa deben evitar los fármacos “oxidantes”. Las transfusiones deben utilizarse sólo en los casos muy graves de deficiencia de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa como el fabismo. Las manifestaciones clínicas de deficiencias hereditarias de enzimas eritrocíticas pueden ser:

- ❖ hemólisis episódica por expansión a oxidantes o infección
- ❖ anemia hemolítica crónica (anemia no esferocítica hereditaria)
- ❖ hemólisis aguda después de ingerir habas (fabismo)
- ❖ metahemoglobinemia
- ❖ ictericia neonatal

La acción intensa de los oxidantes hace que se forme hemoglobina desnaturalizada y cuerpos de Heinz, de modo que los eritrocitos se vuelven menos deformables y pueden ser destruidos más fácilmente por el bazo. La deficiencia de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa es un trastorno ligado al sexo. De manera típica, la hemólisis fármaco inducida comienza uno a 3 días después de la exposición al medicamento y puede acompañarse de dolor en abdomen o dorso. La orina puede adquirir color oscuro, incluso negro. La hemólisis surge especialmente en personas con neumonía o fiebre tifoidea. La hemólisis puede ser fulminante en enfermos con deficiencia de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa y fiebre maculada de las montañas rocosas.

El fabismo puede ser una de las consecuencias más graves de la deficiencia de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa. La hemólisis surge en cuestión de horas a días de haber ingerido las habas. La orina adquiere color rojo u oscuro, y puede surgir a muy breve plazo choque que a veces es mortal. Es más común en niños y suele surgir con variantes que causan deficiencia intensa.

La ictericia puede ocurrir en algunos neonatos con deficiencia de G6PD sin signos inmunológicos de incompatibilidad materno fetal. La ictericia puede ocasionar Kernicterus y retardo psíquico.

Las personas con deficiencia de G6PD deben evitar fármacos patógenos como: sulfametoxazol, fenazopiridina, nitrito de isobutilo, naftaleno, oxidasa de urato. La infección o el tratamiento con fármacos, oxidantes pueden desencadenar crisis hemolíticas y así identificarse la enfermedad. Los signos físicos incluyen esplenomegalia y palidez. Algunos enfermos tienen coluria, tal vez por el metabolismo de grupos hem libres o cuerpos de Heinz.

La deficiencia de G6PD ocurre más frecuentemente en personas de origen mediterráneo y en negros, y se hereda como carácter ligado al cromosoma X. El homocigoto masculino y el homocigoto femenino más a menudo tiene evidencia clínica del defecto que el heterocigoto femenino. Se han encontrado muchos alelomorfos mutantes de la enzima con

características clínicas distintas. La falta de la enzima es más notoria en los eritrocitos más viejos y provoca cifras bajas de glutatión reducido, causando un defecto en los mecanismo de reducción de la célula y volviéndola más vulnerable a la lisis al ser expuesta a oxidantes, sustancias químicas o sustancias vegetales. Hay labilidad incrementada para la formación de cuerpos de Heinz. Una prueba de la deficiencia enzimática es la incubación de las células con fenilhidracina; esto produce gran número de cuerpos de Heinz. Otras pruebas incluyen el análisis directo de enzimas y la medición de glutatión reducido. Las pruebas deberán ejecutarse después que el paciente se ha recuperado de la anemia; los reticulocitos y los eritrocitos jóvenes comúnmente contienen una cantidad adecuada de enzima y pueden ser las únicas células presentes después de un episodio de hemólisis. Esto no se aplica al fabismo, en el que hay deficiencia más intensa de G6PD y disminución enzimática inclusive en los reticulocitos.

Las observaciones de laboratorio realizadas durante períodos de hemólisis activa son las propias de la anemia hemolítica en general. En el frotis sanguíneo se observan poiquilocitos, algunos esferocitos y células contraídas de forma irregular, que se tiñen intensamente y presentan una contracción de la Hb desde una zona de la membrana celular. La deficiencia de G-6PD se puede detectar con cualquiera de las pruebas de exploración selectiva: la prueba de reducción del colorante, la del ascorbato-cianuro o de la mancha fluorescente. La confirmación se realiza con un análisis cuantitativo.

#### EQUIPO:

Baño maría a 37<sup>0</sup>C

#### MATERIAL:

- a) Biológico: Sangre obtenida con EDTA o Heparina
- b) De laboratorio: 6 Tubos de ensayo de 13 x 100 mm
  - 3 Pipetas serológicas de 1 ml
  - 3 Pipetas serológicas de 1 ml
  - 2 Pipeta serológica de 5 ml
  - Papel parafilm

#### TÉCNICA:

1. Agregar 2.0 ml de sangre a un tubo con 0.2 ml de reactivo combinado (Dextrosa NaNO<sub>2</sub> + Azul De Nilo; solución C). Mezclar por inversión 15 veces.
2. Preparar control normal, agregando 2.0 ml de sangre a un tubo sin reactivo.
3. Preparar control positivo, agregando 2.0 ml de sangre a un tubo con 0.1 ml de la solución (a) nitrito de sodio-dextrosa.
4. Incubar 3 horas a 37<sup>0</sup>C.
5. Al terminar la incubación, preparar 3 tubos conteniendo cada uno 5 ml de agua destilada, pipetear 1 gota ó 0.1ml de cada uno de los tubos incubados (problema, control normal y control positivo). Mezclar suavemente.
6. Comparar los tres tubos.

#### INTERPRETACIÓN:

- A) Sangre normal dará un color rojo parecido al control normal.
- B) Sangre deficiente dará un color café similar al control positivo.

FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA  
LABORATORIO DE HEMATOLOGÍA  
“ELECTROFORESIS DE HEMOGLOBINA”

**OBJETIVO(S):**

Que el alumno aprenda a realizar correctamente una electroforesis de hemoglobinas e identificar su utilidad diagnóstica.

**FUNDAMENTO:**

Los diversos tipos de hemoglobinas, como proteínas, toman la carga eléctrica del medio, por lo que pueden, en un soporte adecuado, ser separadas por electroforesis. En ésta, las hemoglobinas muestran velocidades de migración definidas que dependen de la carga neta de la molécula, del medio de soporte utilizado, del pH y de la fuerza iónica de la solución amortiguadora utilizada. Los últimos tres factores pueden ser modificados para obtener los resultados deseados en el laboratorio.

GENERALIDADES:

Electroforesis de la hemoglobina. Las moléculas de hemoglobina en solución alcalina poseen una carga negativa neta y se mueven hacia el ánodo en un sistema electroforético. Aquellas que presentan una movilidad electroforética mayor que las HbA a pH 8,6 se conocen como «hemoglobinas rápidas» y entre ellas se encuentra la Hb Bart y las dos más rápidas, la HbH y la HbI. La HbC es la más lenta de las hemoglobinas comunes. Algunas hemoglobinas en orden de movilidad creciente son HbA., E = O = C, G = D = S, F, A, K, J, la Bart, N = I y H.

La eficacia de la separación varía según diferentes medios y tampones. Ninguno es útil y adecuado para todas las separaciones y para fines de exploración selectiva. Un método práctico para la electroforesis habitual de la hemoglobina es el acetato de celulosa en un pH alcalino (Briere, 1965). Es un método rápido y reproducible que permite separar las hemoglobinas S, F, C, A y A.. La cuantificación de las bandas principales se realiza fácilmente. Si existe una banda S, se debe realizar una prueba de solubilidad o del fenómeno falciforme. La electroforesis en agar-citrato a pH ácido (Milner, 1975) permite una separación de las hemoglobinas que migran junto con el acetato de celulosa: la S de la D y G, y la C de la E y O (Schmidt, 1973). Cuando estos dos métodos se combinan con la electroforesis de cadenas de globina en urea 6M, pueden identificarse muchas variantes de hemoglobina. Como alternativa, la fijación isoelectrica en gel de poliacrilamida proporciona una marcada separación de muchas de las variantes de hemoglobina (Bunn, 1986).

La caracterización final de las hemoglobinas anormales escapa del objetivo del laboratorio clínico. Consiste en la purificación de la hemoglobina anormal con electroforesis en bloque de almidón, en la realización de experimentos de hibridización para determinar si la anomalía reside en la cadena  $\alpha$  o  $\beta$  y en la «impresión digital». En este último procedimiento, las cadenas polipeptídicas se desdoblan por digestión enzimática hacia péptidos que se separan realizando una electroforesis en papel horizontal con cromatografía

vertical posterior. Este mapa de péptidos o «prueba de la huella digital» se compara con el preparado a partir de la hemoglobina normal, pudiéndose así localizar el péptido donde ocurre la anomalía. El péptido anormal se eluye y se determina su contenido de aminoácidos. La secuencia de aminoácidos se ha automatizado. Con la utilización de técnicas de genética molecular, en la actualidad se puede determinar la estructura primaria o la secuencia de aminoácidos de las cadenas globina a través de la determinación de la secuencia base del mRNA o del DNA para las cadenas globina. Este tipo de análisis es menos laborioso que la secuencia de aminoácidos clásica, y en cambio resulta tan fidedigno como ésta (Bunn, 1986). Huisman (1977, 1986) ha revisado las técnicas de identificación de las hemoglobinas.

#### Trastorno de la síntesis de hemoglobina:

La deficiencia de hierro difiere de otros tipos de anemia microcítica por tener un hierro plasmático bajo, saturación disminuida de la transferrina, y un valor bajo de ferritina. Cuando hay una disminución importante en la concentración de hemoglobina globular media (menor de 28%), puede suponerse que su causa es la deficiencia de hierro. Los únicos otros estados que causan una reducción similar en la CHCM son las hemoglobinopatías en las cuales los grupos hemo se separan progresivamente de la molécula de hemoglobina y ocurre sobrehidratación del eritrocito debido a anomalías de las bombas de membrana. Sin embargo, estos estados no se asocian con microcitosis. La eritropoyesis deficiente en hierro, debida ya sea a deficiencia de hierro verdadera o a infección, es también distinguible de otras anomalías de la hemoglobina por proliferación limitada de las células eritroides y una bilirrubina baja.

La anomalía en la síntesis de globina primaria *más* común es un trastorno cuantitativo ya sea en la producción de la cadena alfa o beta como el que se encuentra en las talasemias. Las talasemias difieren en gravedad, dependiendo en parte de sí el paciente es heterocigoto u homocigoto; sin embargo, hay factores modificantes de modo que el genotipo aparente no siempre coincide con el fenotipo. En la talasemia menor (heterocigoto), el único hallazgo puede ser microcitosis y un aumento en la cadena A<sub>2</sub> (a<sub>2</sub>, ~2) o de la hemoglobina fetal. En las formas *más* graves de la talasemia hay fragmentación del eritrocito (poiquilocitosis), punteado y un aspecto hipocrómico en el frotis de sangre. Las cavidades óseas medulares están crecidas, causando deformaciones faciales, y el bazo crece progresivamente durante la niñez debido a su trabajo aumentado para catabolizar los eritrocitos. La hemoglobina fetal (a<sub>2</sub>, 72) está aumentada en la talasemia beta del homocigoto, mientras que la hemoglobina H (~34) está presente en la talasemia alfa. Otros estados parecidos a la talasemia (hemoglobina E y hemoglobina Lepore) difieren en que las moléculas de hemoglobina son estructuralmente anormales, además de la disminución en la síntesis de la cadena. En otros tipos de hemoglobinas anormales, el trastorno de la fijación del hemo lleva a destrucción de hemoglobina intraeritrocítica e hipocromía consiguiente, pero poco o nada de microcitosis. Como no hay manera conocida de mejorar la síntesis de células viables en estas anomalías genéticas, el tratamiento es de sostén con transfusiones de eritrocitos y tratamiento apropiado de las complicaciones como fracturas patológicas e hiperesplenismo.

Criterios para el diagnóstico de talasemia:

1. Anemia microcítica sin deficiencia de hierro
2. Otros miembros de la familia afectados
3. Eritropoyesis inefectiva
4. Anomalías de la hemoglobina

Los trastornos de la síntesis de porfirina están representados por las anemias sideroblásticas. La anomalía se reconoce por la presencia de sideroblastos mitocondriales frecuentes en la médula ósea. En algunos pacientes hay una hipocromía general y microcitosis al examen del frotis sanguíneo; en otros hay macrocitosis sola con una población pequeña de células hipocrómicas. La médula eritroide es hiperplásica (proporción E/G > 1:1). La eritropoyesis es insuficiente con poco o ningún aumento en los reticulocitos circulantes. El hierro plasmático está alto y saturada la transferrina. La pro-toporfirina se encuentra habitualmente baja, aunque en unos pocos pacientes una protoporfirina elevada sugiere una anomalía asociada en la actividad de la quelatasa del hemo. El grupo heterogéneo de estados caracterizados por el dato de sideroblastos mitocondriales es mejor dividido en: (1) un grupo microcítico hipocrómico que tiene sólo una anomalía en la síntesis de hemoglobina (porfirina), y (2) un grupo normocrómico o macrocítico con alteraciones nucleares y citoplásmicas en los precursores del eritrocito. Esta no es una distinción absoluta ya que algunos agentes (alcohol) producen una anomalía selectiva en algunos pacientes y una lesión combinada en otros.

Las anomalías aisladas en la síntesis de porfirina ocurren en hombres como un trastorno hereditario (ligado al sexo), con sobrecarga parenquimatosa de hierro y las manifestaciones clínicas de hemocromatosis. Algunos de estos pacientes responden a la piridoxina y algunos no, una diferencia que sólo puede determinarse mediante prueba terapéutica. Mientras que se han informado cambios sideroblásticos en una gran variedad de enfermedades, incluyendo artritis reumatoidea, carcinoma, mielofibrosis, anemia hemolítica, porfiria cutánea, la razón de la anomalía en estos estados no está clara. Un número de agentes químicos y medicamentos han sido aplicados, incluyendo alcohol, plomo, isoniacida y cicloserina, etc. Aquí el efecto se supone que es sobre la síntesis de porfirina y, más específicamente sobre la síntesis del ácido aminolevulínico. La anemia sideroblástica de tipo citoplásmico puro también puede desarrollarse en individuos de ambos sexos sin que se conozca la causa. Anomalías citoplásmicas y nucleares combinadas también se encuentran como resultado del uso de medicamentos y como una anomalía intrínseca de la médula ósea. Puede haber cambios megaloblásticos en la médula ósea, mientras que la sangre periférica con más frecuencia muestra una anemia macrocítica o dimórfica que una anemia microcítica. Depresiones variables en los valores circulantes de granulocitos y plaquetas habitualmente están presentes. El estado más común es la anomalía combinada encontrada en el alcohólico, donde el cambio megaloblástico se asocia con una anomalía en el metabolismo del ácido fólico y hay grados variables de sideroblastosis. Las mitocondrias de los sideroblastos se ven también en anemia macrocítica (de DiGuglielmo). Muchos de estos pacientes tienen alteraciones en el número de plaquetas (ya sea aumento o disminución) y leucopenia moderada.

Cuando hay una posibilidad de una hemoglobina anormal o un defecto en la producción de globina, se realizan pruebas de estabilidad de pH de la hemoglobina y movilidad electroforética. Las pruebas de selección común incluyen electroforesis con acetato de celulosa, desnaturalización de álcali y una prueba de selección de drepanocito.

Electroforesis con acetato de celulosa:

Eritrocitos lavados son sometidos a lisis, tratados con tolueno para eliminar el estroma, y aplicados a una membrana de acetato de celulosa. Después de electroforesis a pH de 8.8, la membrana es despejada y teñida con Ponceau 5 para examen y cuantificación de las bandas de hemoglobina. Las cantidades y posiciones relativas de las hemoglobinas A<sub>2</sub>, S, C, E y A en varias de las hemoglobinopatías más comunes se muestran en la. Algunos de los mutantes de hemoglobina más raros sólo pueden identificarse efectuando estudios más sofisticados de movilidad de la hemoglobina, estabilidad al calor, disociación de O<sub>2</sub> e inclusive secuencia de aminoácidos.

La identificación precisa de muchas hemoglobinopatías y las diversas formas de talasemia pueden requerir electroforesis con agar o gel de almidón así como cuantificación de las hemoglobinas A<sub>2</sub> y F. El valor de la hemoglobina F se mide sacando partido de su mayor resistencia a la precipitación en pH alcalino. El hemolisado del eritrocito es brevemente expuesto a una solución diluida de hidróxido potásico y la hemoglobina precipitable removida por precipitación y filtración de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La cantidad de hemoglobina F que queda en el flotante es medida luego colorimétricamente. La hemoglobina S se identifica por su capacidad única para formar tactoides y por eso altera la forma del eritrocito a la desoxigenación. Esta propiedad física es la base de un número de pruebas de selección rápida, incluyendo la preparación de metabisulfito y la prueba de solubilidad. Estos métodos deben ser considerados inferiores a la técnica de electroforesis con acetato de celulosa, no obstante, ya que no depende la cantidad de hemoglobina S ni localizan la presencia de otras hemoglobinas anormales.

#### EQUIPO:

Cámara de electroforesis

Fuente de poder para electroforesis

Equipo de aplicación de muestras para electroforesis.

#### MATERIAL:

a) Biológico: Hemolisado de la muestra problema

b) De laboratorio: Tubos capilares

Tiras de papel filtro de 25 x 4 cm

Placas de acetato de celulosa Helena para electroforesis de hemoglobina

Recipiente para humedecer las placas de acetato de celulosa

Amortiguador para electroforesis de hemoglobinas

Solución colorante de Ponceau S

Ácido acético al 5%

Metanol q.p.  
Ácido acético al 20% en metanol  
4 Recipientes para tinción

#### TÉCNICA:

1. Colocar 50 ml del amortiguador en cada uno de los compartimentos de la cámara de electroforesis.
2. Humedecer las tiras de papel filtro en el amortiguador y colocarlas sobre los puentes de la cámara, teniendo cuidado que hagan contacto con el amortiguador.
3. Por lo menos 5 minutos antes del corrimiento, humedecer las placas de acetato de celulosa en el amortiguador introduciéndolas lentamente, de manera que lo absorban por capilaridad. Previamente, es conveniente marcar las placas, por el reverso, para identificar el sitio de aplicación y el orden de las muestras.
4. Usando un tubo capilar, llenar los pozos de la base de aplicación con las muestras problema y control. Si no se van a aplicar en un lapso de 5 minutos, cubrirlas para evitar la evaporación.
5. Hacer un ensayo previo con el aplicador tomando una muestra y aplicándola sobre una toalla desechable. Tomar nuevamente las muestras dejando todo listo para ser aplicadas.
6. Sacar la placa de acetato de celulosa del amortiguador y eliminar el exceso del mismo con papel secante o toalla desechable. Colocarla sobre la base de aplicación, de manera que la aplicación sea del lado catódico.
7. Poner el aplicador, cargado con los hemolisados, sobre la base y aplicarlo presionando el botón firme y suavemente hasta tocar la placa. Mantenerlo presionado durante 10 segundos para permitir su correcta absorción.
8. Colocar la placa en la cámara, con la superficie del acetato hacia abajo y el punto de aplicación cerca del cátodo. Poner un portaobjetos sobre las placas para que con el peso se asegure un buen contacto.
9. Cubrir la cámara y ajustar la fuente de poder a 3mA por placa. Dejar correr la electroforesis por 20 minutos.
10. Después del corrimiento, sacar las placas de la cámara sumergirlas en la solución colorante de Ponceau S durante 10 minutos.
11. Lavar las placas en tres baños sucesivos de ácido acético al 5% hasta eliminar el exceso de colorante y conseguir que el fondo de la placa quede blanco.
12. Comparar las movilidades de las bandas de cada problema con el control. Para conservar el estudio y facilitar su observación, es necesario aclarar las tiras de la siguiente manera:
  - 12.1 Sumergirlas en metanol q.p. durante 2 minutos.
  - 12.2 Transferirlas a la solución aclaradora de ácido acético al 20% en metanol y dejarlas 5 minutos.
  - 12.3 Secar la placa al aire o mediante una parrilla que emita calor suave.

#### INTERVALOS DE REFERENCIA:

Patrón electroforético =

Adulto = A + A

Recién nacido = A + F

**NOTA:**

La electroforesis es un método de gran importancia en el estudio de las hemoglobinopatías, aunque parece ser rara su frecuencia, no lo es en realidad. En el Estado de Veracruz existen una gran cantidad de hemoglobinopatías.

FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA  
LABORATORIO DE HEMATOLOGÍA  
“RECUENTO DE EOSINÓFILOS”

**OBJETIVO(S):**

Que el alumno aprenda y practique el recuento de eosinófilos tanto por el método directo (método de Dunger) como por el método indirecto (hemograma), ya que esta determinación es importante para seguir el curso de algunas enfermedades sobretodo de tipo alérgico.

**FUNDAMENTO:**

En esta práctica se utiliza el método de Dunger, el cual utiliza una solución acuosa de eosina o flexina para lisar los glóbulos rojos y a su vez teñir los gránulos de los eosinófilos. La solución acuosa hipotónica lisa también los glóbulos blancos, pero los eosinófilos son más resistentes a esta acción; la adición del 10% de acetona disminuye la tendencia de éstos a romperse.

GENERALIDADES:

El conteo de los eosinófilos se practica al diluir sangre entera con una solución colorante, la cual contiene Filoxina B que tiñe de rojo a los eosinófilos; todos los otros leucocitos se conservan, pero no se tiñen. La muestra diluida se mezcla bien y se monta en ambos lados del hemacitómetro y se permite que las células se asienten. Con el uso del objetivo de bajo aumento se cuentan los eosinófilos en el área rayada total de ambas cámaras de conteo. Los eosinófilos se presentan de color rojo naranja brillante y son claramente distinguibles de los otros leucocitos. El conteo directo de los eosinófilos es inherentemente inadecuado debido a su escaso número y con el propósito de mejorar su conteo, deben contarse cuando menos 100. Esto implica la carga repetida del hemacitómetro y el conteo de los eosinófilos hasta que se alcanza ese número. El cálculo final se basa en el volumen total contado.

Los Eosinófilos tienen actividad fagocítica, es decir que "se comen" a los agentes extraños al organismo. Sus gránulos tienen sustancias para degradar aquello que incorporan. Tienen un papel muy importante en las parasitosis donde con sus gránulos degradan las larvas para que puedan ser ingeridas por los neutrófilos y los macrófagos. El eosinófilo modula y regula las reacciones alérgicas.

El eosinófilo se origina de la célula multipotencial o de multilinaje UFC-GEMM, la cual se intenta diferenciar a la UFC-Eo por acción de los factores de crecimiento FEC-GM, IL-3 e IL-5. Sólo este último tiene especificidad para linaje de eosinófilos y es la principal citocina requerida para su producción. El eosinófilo sufre una maduración morfológica parecida a la del neutrófilo. No es posible diferenciar morfológicamente a los precursores del eosinófilo de los del neutrófilo con el microscopio de luz sino hasta la etapa del mielocito, cuando aparecen los gránulos cristaloides acidófilos típicos del eosinófilo.

El eosinófilo maduro tiene un diámetro de 12 a 17  $\mu\text{m}$ . Por lo regular, el núcleo no tiene más

de 2 o 3 lóbulos, y el citoplasma está completamente lleno de gránulos. Los gránulos se hallan limitados por una membrana fosfolípida y tiene una porción central cristaloides rodeada por una matriz. Estos gránulos contienen cuatro proteínas principales: proteína

básica principal, proteína catiónica eosinofilia, peroxidasa eosinofilia y neurotoxina derivada de eosinófilo. La PBP se sitúa en la porción central cristalóide, mientras que las otras tres proteínas se encuentran en la matriz de los gránulos, los cuales también contienen a las enzimas fosfatasa ácida, glucuronidasa, catepsinas, aril-sulfatasa, histaminasa, colagenasa y catalasa.

La mayor parte de la población de eosinófilos en el cuerpo está por debajo de la capa epitelial en los tejidos que están expuestos al ambiente externo, como las vías nasales, piel y vías urinarias. Estas células pasan muy poco tiempo en la sangre periférica (de 1 a 8 hrs) antes de migrar a los tejidos, donde logran vivir durante varias semanas. Los eosinófilos tisulares pueden regresar a la circulación y a la médula ósea. Los eosinófilos tienen múltiples funciones biológicas y contribuyen a una diversidad de mecanismo de defensa inmunitaria. Su producción y función están influenciados por la estimulación celular del sistema inmunitario.

La eosinofilia es un aumento en el número de eosinófilos en la sangre mayor de  $0.4 \times 10^9/L$ . La cuenta directa de eosinófilos con la cámara de Fuchs-Rosenthal y líquido de dilución especial que contenga eosina y acetona es más precisa que la cuenta leucocitaria total y diferencial. La eosinofilia ocurre en padecimientos alérgicos como el asma, en infestaciones parasitarias, en diversas enfermedades de la piel, en algunas neoplasias malignas como la carcinomatosis diseminada y aproximadamente en 15% de los pacientes con enfermedad de Hodking. También se halla en algunos enfermos de poliarteritis nudosa y en la eosinofilia pulmonar. Es tan común la eosinofilia moderada en países tropicales que se puede considerar como “normal”. Probablemente presente una reacción a la infestación parasitaria ligera. La leucocitosis eosinofilia leucémica ocurre como parte de una leucemia granulocítica crónica y también se ha descrito una leucemia eosinofílica muy rara. <sup>(2)</sup>

La función primordial de los eosinófilos es liberar el contenido de los gránulos o reactivos el oxígeno generado por las membranas celulares para lesionar al organismo diana o la célula agresora.

Padecimientos vinculados con trastornos de eosinófilos:

- ⊗ **ENFERMEDADES ALÉRGICAS:** la alergia y las alteraciones atópicas, como el asma bronquial y la rinitis estacional (fiebre del heno), se caracterizan por la presencia de eosinofilia. Los eosinófilos se encuentran en sangre periférica, médula ósea, esputo y excreciones nasales y conjuntivales.
- ⊗ **TRASTORNOS DE LA PIEL:** la dermatitis atópica y el ecema muchas veces van acompañadas de eosinofilia, especialmente en niños. En el perfigo, la eosinofilia resulta característica. A menudo también existe urticarias agudas y no es corriente en los casos de urticaria crónica.
- ⊗ **INFECCIONES PARASITARIAS:** en la triquinosis, los eosinófilos empiezan a aumentar en la sangre al cabo de pocos días después de la infección. Se observa leucocitosis y eosinofilia durante meses en las infestaciones de la larva migran visceral (lombriz del perro y del gato).

- ☼ ENFERMEDADES INFECCIOSAS: en la escarlatina, la eosinofilia suele asociarse al exantema cutáneo, que es probablemente de naturaleza alérgica. La corea puede asociarse con eosinofilia. También se observa en las infecciones agudas.
- ☼ EOSINOFILIAS PULMONARES: el síndrome de loeffler se caracteriza por repetidos exudados pulmonares transitorios acompañados de tos, que muchas veces producen un esputo que contiene eosinófilos. La eosinofilia pulmonar tropical es un síndrome de tos paroxística y broncopasmo asociado con una eosinofilia intensa.
- ☼ HEMOPATIAS: se produce eosinofilia en la leucemia mieloide crónica, en algunos casos de leucemia mielomonocítica aguda y en menor grado, en otros trastornos mieloproliferativos. En la anemia perniciosa puede detectarse una eosinofilia leve en médula y sangre.
- ☼ FARMACOS: Se ha comunicado varios fármacos responsables de eosinofilia: pilocarpina, fisostigmina, digital, ácido paraaminosalicílico, sulfamidas, etc. En cambio se supone que la atropina disminuye el número de eosinófilos. La eosinofilia hereditaria es rara en ausencia de otras causas reconocidas de eosinofilia.

La eosinopenia es difícil de establecer debido a los valores normales de estas células. Aunque pueden no encontrarse eosinófilos en una diferencial de 100 células, un rastreo del frotis de sangre bajo un aumento de 100 a 400 x magnificación debe revelar la presencia de unos cuantos eosinófilos. Si después de esto no se notan eosinófilos, probablemente hay una eosinopenia presente. La eosinopenia se puede ver en situaciones estresantes agudas, reacciones inflamatorias, y con la administración de glucocorticosteroides, ACTH, adrenalina y prostaglandinas. Los glucocorticosteroides y la epinefrina inhiben la liberación de eosinófilos de la médula ósea y aumentan su marginación. La infección bacteriana puede causar una disminución en los eosinófilos debido a una marginación creciente y a la migración de estas células a los tejidos, pero la recuperación se puede acompañar con eosinofilia leve.

#### EQUIPO:

Microscopio

Agitador mecánico de pipetas

Contador de células

#### MATERIAL:

a) Biológico: Sangre obtenida con EDTA

b) De laboratorio: Portaobjetos

2 Pipetas de Thoma para glóbulos blancos con boquilla

1 Cámara de Neubauer con cubreobjetos

Puente de tinción

Líquido de Dungen

Colorante de Wright

Solución amortiguadora de fosfatos

Líquido de Turk

**TÉCNICA:**

1. Utilizando una pipeta de Thoma para glóbulos blancos, aspirar sangre hasta la señal 0.5 y aspirar líquido de Dungen hasta la señal 11; se obtiene así una dilución 1:20.
2. Agitar la mezcla diluida en forma habitual, cargar ambos lados de la cámara de Neubauer y contar las células tan pronto como se hayan sedimentado, de manera similar al recuento de leucocitos totales y utilizando el objetivo seco débil. Es importante diferenciar los eosinófilos de los neutrófilos que no se hayan lisado; para ello debe observarse que el citoplasma de la célula esté teñido con la eosina (color naranja fuerte) y no confundirlo con el color naranja menos intenso que se observa en todo el fondo de la cámara.
3. Hacer el cálculo de la misma forma que para los leucocitos totales, multiplicando la suma de los eosinófilos contados en los 4 cuadros grandes por 50, y nos da el número de eosinófilos por  $\text{mm}^3$ . Para obtener resultados más exactos debe contarse las células de las 2 cuadrículas y sacar un promedio para el cálculo.
4. Para comprobar los resultados obtenidos en valores absolutos por este método con los que se obtienen en %, hacer también un hemograma y un recuento de leucocitos; en el hemograma tendremos directamente el % de eosinófilos y a partir del recuento de leucocitos obtendremos el valor absoluto. Para transformar el número de eosinófilos por  $\text{mm}^3$ , obtenido por el método de Dungen, a células % hacer el siguiente cálculo:

$$\% \text{ de Eosinófilos} = \frac{\text{No. De Eosinófilos por } \text{mm}^3 \times 100}{\text{No. De Leucocitos por } \text{mm}^3}$$

**INTERVALOS DE REFERENCIA:**

Absoluto..... 50-400 por  $\text{mm}^3$   
Relativo..... 1-4%

FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA  
LABORATORIO DE HEMATOLOGÍA  
“REACCIÓN DE LA MIELOPEROXIDASA (PEROXIDASA LEUCOCITARIA)”

**OBJETIVO(S):**

Que el alumno aprenda a identificar la reacción tanto positiva como negativa de las células sanguíneas a la reacción citoquímica de peroxidasa, así como su utilidad en el diagnóstico de enfermedades.

**FUNDAMENTO:**

La observación de gránulos de peroxidasa en ciertos leucocitos depende de su contenido de una enzima a base de porfirina de hierro (peroxidasa) que facilita la oxidación de la bencidina por el peróxido de hidrógeno. En estas condiciones el nitroprusiato sódico forma un compuesto verde-amarillento con la bencidina oxidada, lo que vuelve visibles a los gránulos.

GENERALIDADES:

Citoquímica en hematología se refiere a los métodos de tinción usados para identificar la composición química de las células sin alterar en forma significativa su morfología. Las células se incuban con substrato que reaccionan con constituyentes celulares determinados. La citoquímica es útil en particular para determinar a cual línea celular pertenecen los blastos en la leucemia aguda. Las reacciones de tinción citoquímica son de 2 tipos: enzimáticas y no enzimáticas. La más útil es la mieloperoxidasa se emplea para diferenciar blastos de la línea mieloides de linfoblastos.

La mieloperoxidasa se almacena en los gránulos primarios de las células mieloides, incluyendo neutrófilos, eosinófilos, y monocitos, pero los linfocitos no la contienen.

La mieloperoxidasa es una enzima con la capacidad de catalizar la oxidación de sustancias mediante peróxido de hidrógeno. La actividad de la mieloperoxidasa se detecta al incubar la muestra fijada en una solución de peróxido de hidrógeno, p-fenilenodiamina y catecol. Los sitios de actividad de la mieloperoxidasa se identifican por un producto de reacción insoluble de color negro pardo. Esta enzima está presente en neutrófilos, eosinófilos y monocitos.

Los neutrófilos y sus precursores exhiben granulación intracelular de color negro pardo y los monocitos se tiñen con menos intensidad que éstos; los linfocitos no exhiben actividad de mieloperoxidasa. La tinción de mieloperoxidasas es útil en la diferenciación entre las leucemias mieloblásticas agudas y las leucemias linfoblásticas agudas.

La defensa del organismo está mediada por las células del llamado sistema retículo endotelial, de las cuales los polimorfonucleares neutrófilos constituyen la primera línea de defensa inespecífica. La mieloperoxidasa es la proteína más abundante en los neutrófilos y es la única peroxidasa que cataliza la conversión del peróxido de hidrógeno y cloruro a ácido hipocloroso. Este es un potente agente oxidante que contribuye al mecanismo de

defensa contra los agentes infecciosos; sin embargo, puede ser capaz de actuar sobre las células del hospedero en caso de activación incontrolable o excesiva e inactivar factores humorales. Dado el amplio espectro de reactividad, el ácido hipocloroso es un mediador de daño hístico en numerosos procesos inflamatorios. Se presentan algunas características físico-químicas, el mecanismo de reacción, la biosíntesis y la relación de la enzima mieloperoxidasa con diferentes procesos patológicos.

La mieloperoxidasa es una enzima ampliamente distribuida en el organismo y sus fuentes fundamentales las constituyen los leucocitos (neutrófilos y monocitos) y los macrófagos a pesar de que ha sido aislada a partir de diferentes fluidos biológicos (saliva, líquido sinovial y semen, entre otros) y también de diferentes tejidos (corazón, riñón, piel, hígado y placenta). No obstante las fuentes más empleadas son los neutrófilos, donde la enzima se encuentra localizada a nivel lisosomal, en los gránulos azurófilos. Constituye del 2-5 % de las proteínas del neutrófilo con una concentración en sangre humana normal.

Esta enzima fue aislada por primera vez por Agner en 1941, denominándola verdoperoxidasa. Posteriormente en 1958, el propio Agner la purificó en forma cristalina y en 1977 Harrison tuvo igual resultado.

## **CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS**

La MPO es una glicoproteína tetramérica, constituida por 4 subunidades formando 2 homodímeros. Cada uno de ellos contiene una subunidad  $\alpha$  (pesada) de aproximadamente 59 kDa y una subunidad  $\beta$  (ligera) de aproximadamente 14 kDa. El peso molecular de la enzima se estima entre 130-150 kDa. Las subunidades pesadas se unen a través de un enlace bisulfuro simple y a cada una de ellas se le une covalentemente un grupo prostético hemo. Estas subunidades son las únicas glicosiladas y contienen entre 2-4 % de carbohidratos. Se reporta que esta proteína es fuertemente catiónica con un punto isoeléctrico mayor de 10 y su pH óptimo es de 5.5.

El contenido de aminoácidos se caracteriza por presentar aproximadamente 1 150 residuos, que se corresponden con 573 aminoácidos cada homodímero. De ellos 466 forman la subunidad pesada y 107 la subunidad ligera.

El patrón espectrofotométrico muestra un máximo de absorbancia a 430 nm, con otros picos a 375, 575, 620 y 690 nm.

## **MECANISMO DE REACCIÓN**

Los neutrófilos contienen 4 formas de MPO, las cuales se denominan compuesto I, compuesto II, compuesto III y MPO nativa o férrica, con una similitud en su composición aminoacídica y actividad, así como en sus propiedades ópticas. No obstante se han observado diferencias en relación con la intensidad de absorción a 430 nm y 620 nm. La MPO reacciona con el  $H_2O_2$  proveniente de las células fagocitarias activadas por contacto con partículas extrañas, formando un complejo enzima-sustrato con una fuerte capacidad oxidativa. Este complejo se combina con el haluro, generalmente cloruro, que se oxida para formar el ácido hipocloroso (HOCl). El compuesto I puede ser reducido a compuesto II

por un exceso de  $H_2O_2$ . Este compuesto II, a pesar de ser bastante estable puede reducirse a MPO férrica en presencia de un agente reductor o el radical superóxido ( $O_2^-$ ) o también puede oxidarse a compuesto III bajo concentraciones elevadas de  $H_2O_2$  (2-3 mM) Por otra parte la MPO nativa puede ser oxidada por el  $O_2$  a oximieloperoxidasa (compuesto III).

## **ACTIVIDAD Y ENFERMEDAD**

El incremento de la actividad de la MPO se ha reportado en varios procesos patológicos y está asociada con un aumento del riesgo al estrés oxidativo, como en el caso de las enfermedades infecciosas (generales o locales), las enfermedades inflamatorias (artritis reumatoidea) y la isquemia/reperfusión.

En estos casos se reporta un aumento significativo de la actividad de MPO, en proporción directa al número de neutrófilos infiltrados en el tejido, por lo que se puede utilizar su actividad como índice de migración leucocitaria y por lo tanto de estrés oxidativo.

### **Enfermedades del sistema respiratorio:**

En la fibrosis quística, la actividad MPO está aumentada proporcionalmente al grado de obstrucción de las vías respiratorias que presentan estos pacientes. La enzima por la vía de inactivación de la  $\alpha$ -1 antiproteasa contribuye a incrementar la actividad de la elastasa de los neutrófilos sobre la elastina pulmonar, la cual desempeña una importante función en la fisiopatología de la enfermedad.

Con respecto al daño pulmonar en pacientes fumadores se reporta que en fumadores inveterados hay un incremento de ácidos grasos saturados libres que afectan el metabolismo oxidativo de los polimorfonucleares. Se produce un aumento de la actividad MPO y la producción de HOCl, con lo que se amplifica el daño oxidativo mediado por esta enzima en los pulmones.

### Enfermedades del sistema circulatorio:

La MPO es capaz de generar especies reactivas que dañan lípidos y proteínas, y parece contribuir a la aterogénesis a través de las reacciones oxidativas que ésta cataliza. El sistema MPO- $H_2O_2$  al tener como sustrato la L-tirosina produce el radical tirosilo, que es capaz de estimular la peroxidación lipídica. Esta peroxidación es vital para la transformación de las LDL en partículas aterogénicas.

### Enfermedades del sistema digestivo:

Estudios en pacientes con cirrosis hepática y hepatitis crónica muestran niveles aumentados de MPO. Cuando se acompañan de esplenomegalia este ascenso es mayor. El incremento es siempre más evidente en la primera entidad. Lo anterior sugiere la función de la MPO en la fisiopatología del hiperesplenismo relacionado con estas enfermedades.

### Enfermedades del sistema hemolinfopoyético:

La MPO se utiliza como índice de diferenciación entre las leucemias linfoblásticas y mieloblásticas, por el aumento de la enzima en estas últimas. En los pacientes sickléemicos se reportan aumentos significativos de MPO, con una correlación inversa a la concentración de hemoglobina, lo que sugiere que los polimorfonucleares y el sistema de complemento participan en los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad.

Se ha encontrado que el sistema MPO-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> -Cl es capaz de inactivar las células infectadas por el HIV. En este mecanismo se utiliza el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> elaborado por las propias células infectadas sin necesidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exógeno. En estudios in vitro se demostró que la actividad antiviral se logra a concentraciones bajas de MPO, concentraciones mayores resultan citotóxicas.

### Otras enfermedades:

La función de la MPO en la patogénesis de la catarata se demostró al evaluar el efecto de la MPO sobre el cristalino de animales viejos, en los cuales se produjo opacidad del lente.

Los niveles de lipoperóxidos (LPO) y MPO en el vítreo de pacientes vitrectomizados con retinopatía diabética proliferativa se encuentran aumentados, lo cual sugiere que la producción de especies reactivas del oxígeno (ERO) y los mecanismos inflamatorios participan en la patogénesis de la enfermedad. Estos niveles se encuentran elevados en la retina de pacientes con melanoma coroidal, lo que evidencia su relación con la retinopatía asociada al tumor.

En los pacientes con trisomía 21 se encuentran bajos niveles de superóxido y una actividad reducida de MPO, por lo que se produce un desbalance en la producción de ERO en los neutrófilos de esos niños y hace que aumente el daño oxidativo en estos pacientes.

## **LEUCEMIAS AGUDA**

### A- LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA (LMA)

Neoplasia clonal del tejido hemopoyético, caracterizada por la proliferación de células blásticas anormales de estirpe mieloide en la médula ósea y menor producción de células hemáticas normales, condicionando anemia y trombopenia.

#### **ETIOLOGIA Y PATOGENIA:**

A pesar de ser una enfermedad de etiología desconocida existen tres factores ambientales que intervienen como agentes causales: radiación en altas dosis, exposición al benceno o derivados por largo tiempo y tratamiento a base de agentes alquilantes y otros citotóxicos.

Los trastornos mieloproliferativos crónicos y los síndromes mielodisplásicos pueden evolucionar hacia una LMA.

Pacientes con síndromes de inmunodeficiencia o con enfermedades con anomalías cromosómicas (S. de Down, S. de Bloom, Anemia de Fanconi etc.) presentan una mayor incidencia en el desarrollo de una LMA.

#### EPIDEMIOLOGIA:

Su incidencia es de 1,5 casos por 100.000 habitantes/año. Su frecuencia aumenta con la edad. Comprende el 80 % de las leucemias agudas en adultos y del 15-20 % en niños. Es la leucemia más frecuente en neonatos.

#### CLASIFICACION:

La más utilizada es la del FAB (grupo francoamericano británico), reactualizada recientemente. Divide a la LMA en 7 tipos morfológicos con varios subtipos:

- Mo: Leucemia mieloblástica con diferenciación mínima
- M1: Leucemia mieloblástica mal diferenciada
- M2: Leucemia mieloblástica diferenciada
- M3: Leucemia promielocítica. (M3-V: LPA variante hipogranular)
- M4: Leucemia granulocítica monocítica (M4-Eo: con eosinofilia medular)
- M5a: Leucemia monoblástica
- M5b: Leucemia monocítica
- M6: Eritroleucemia
- M7: Leucemia megacarioblástica

Los síntomas y signos iniciales más frecuentes son los secundarios a la infiltración medular:

- Anémico: de variable intensidad según el momento del diagnóstico, la cifra de hemoglobina y la edad del paciente.
- Hemorrágico: espontáneo si la cifra de plaquetas es menor de  $20 \times 10^9 /L$ ; en forma de diátesis hemorrágica de cualquier localización (púrpura, epistaxis, hematuria, etc).
- Febril: en dependencia de la neutropenia, generalmente con temperatura no muy elevada y sin foco aparente.

La LMA-M3 suele cursar con un síndrome de coagulación intravascular diseminada (CID) con intensa hiperfibrinólisis. En las LMA-M4 y M5 pueden aparecer "leucémides" dérmicas rosáceo-purpúricas (20-35% de los casos) e hipertrofia amigdalal o gingival. Las células leucémicas pueden infiltrar cualquier órgano, pero raramente originan una disfunción significativa (hígado, bazo y ganglios linfáticos entre el 10-30% de los casos y SNC del 1-2% de los adultos y entre el 5-15% en niños son los más frecuentes). El 5% de los pacientes presentan cifras leucocitarias  $>100 \times 10^9 /L$  ocasionando leucocitosis en la circulación del SNC (síntomatología neurológica inespecífica o hemorragia intracerebral), del pulmón (síndrome pseudoasmático o distress respiratorio agudo) o del pene (priapismo).

## TRATAMIENTO:

### 1. TERAPIA DE SOPORTE:

Mantener la hemoglobina por encima de 9-10gr/dl mediante concentrados de hematíes y las plaquetas por encima de  $20 \times 10^9 /l$  mediante concentrados de plaquetas o trombofóresis de donantes. Administrar plasma fresco congelado (PFC) o crioprecipitados para el tratamiento de la CID. Realizar profilaxis antiinfecciosa con quinolonas orales. En el caso de aparición de fiebre y tras la toma de los diversos cultivos, administrar tratamiento antibiótico empírico con asociaciones de antibióticos de amplio espectro a dosis máximas por vía endovenosa (según protocolos) y mantener al paciente con medidas de aislamiento. Administrar granulocitos procedentes de aféresis en sepsis documentadas que no responden al tratamiento antibiótico. Prevenir la nefropatía úrica con la hiperhidratación, alcalinización urinaria y Alopurinol; las náuseas con los antieméticos actuales (Ondansetron, Granisetron, etc.) y realizar protección gástrica. Es necesario un soporte psicológico adecuado, no sólo en la crisis emocional inicial, sino también a medida que las expectativas de vida se prolongan (miedo a la recaída, depresión, disminución de la autoestima, disfunciones sexuales, etc.).

### 2. TRATAMIENTO ESPECÍFICO:

La quimioterapia citotóxica se basa en el concepto de que la médula contiene dos poblaciones competitivas de células (leucémicas y normales) y que, para que se logre la recuperación de la hemopoyesis normal, se necesita la supresión profunda de las células leucémicas hasta que no se detecten morfológicamente en los aspirados y/o biopsias medulares. Recordar que, al contrario que en las leucemias agudas linfoblásticas (LAL), las drogas citotóxicas utilizadas en las LMA son menos selectivas para la población leucémica, lo que unido a la escasa reserva medular y a la mayor edad de los pacientes, determina una intensa mielosupresión. El tratamiento por lo común se inicia con dos o más fármacos que incluyan una Antraciclina o un antibiótico antraquinónico y el Arabinósido de Citosina (tratamiento de inducción a la remisión). Se observa escasa o mala respuesta en pacientes con LMA secundarias a quimio o radioterapia anterior, en procedentes de síndromes mielodisplásicos y en ancianos. El Ácido Transretinoico logra un 80% de remisiones completas en pacientes afectos de LMA-M3, mediante un proceso de diferenciación "in vivo" de las células leucémicas. Los candidatos al Transplante de Médula Ósea (TMO) alógena deben de ser transfundidos con productos hemáticos sin virus citomegálico (salvo que sean portadores positivos). Una vez conseguida la remisión y para evitar la recaída (menos de 6 meses en evolución natural) es preciso continuar con un tratamiento de post- remisión (consolidación) o incluir al paciente en programa de TMO autólogo (TAMO), alogénico (si existe donante HLA compatible) o autólogo por cultivos celulares de sangre periférica (TASP), siempre que cumpla los criterios de indicación del TMO. Actualmente se consiguen tasas de remisión cercanas al 80-90% en niños, 70% en adultos jóvenes, 50% en personas de edad intermedia y 25% en los ancianos. La media de supervivencia es de aproximadamente 12 m. Si se logra remisión, 25% vivirán alrededor de 2 años y un 10% alrededor de 5 años. Actualmente con el TMO en primera remisión completa se logran

porcentajes de supervivencia libre de enfermedad a los 4 años de entre 30 y el 50%, según sea autólogo o alogénico.

### **LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA (LLA)**

Proliferación clonal de células linfoides inmaduras morfológicamente constituidas por linfoblastos.

#### **ETIOLOGÍA Y PATOGENIA:**

Es la forma más frecuente de leucemias en niños (80-90%) y antes de los 15 años de vida ocupa el segundo lugar entre las neoplasias más comunes. Su máxima incidencia es en niños menores de 10 años. Existen algunos tipos de leucemias T y linfomas producidos por virus (HTLV-I y Epstein Barr), pero por lo demás sirven las mismas consideraciones que en las LMA.

#### **CLASIFICACIÓN:**

Como en las anteriores, se utiliza la morfología del grupo FAB, que las divide en tres tipos:

L1: la más frecuente en niños.

L2: la más frecuente en adultos y de mal pronóstico.

L3: la más infrecuente y de peor pronóstico.

Según la estirpe mayoritaria de los linfoblastos (B ó T) existe otra clasificación inmunológica que las divide fenotípicamente en Pre-B precoz, Pre B, B y T. Mediante la evaluación del cariotipo pueden subclasificarse citogenéticamente en otros cuatro grupos, ya que este tipo de leucemias presentan frecuentemente traslocaciones cromosómicas.

#### **EQUIPO:**

Microscopio

#### **MATERIAL:**

- a) Biológico: Sangre obtenida con EDTA
- b) De laboratorio: Portaobjetos
  - Puentes de tinción
  - Pipeta Pasteur con bulbo de hule
  - Solución fijadora
  - Solución colorante
  - Aceite de inmersión.

#### **TÉCNICA:**

1. Hágase un frotis de sangre fresca y déjese secar al aire.
2. El frotis se fija en la solución fijadora por 1 minuto.
3. Una vez pasado el tiempo, lavar con agua de la llave por 30 segundos.
4. Secar al aire perfectamente.
5. Sumergir en la solución colorante por 30 segundos.

6. Una vez pasado el tiempo, lavar con agua de la llave.
7. Secar al aire.
8. Obsérvese el frotis con objetivo de inmersión y clasifíquense 100 células como peroxidasa positivas (citoplasma verde-amarillento) o negativas.

#### INTERPRETACIÓN:

Con la tinción de la peroxidasa se detectan enzimas que contienen la estirpe granulocítica. La reacción de peroxidasa es positiva en todos los estadios de desarrollo de las células de la serie granulocítica (excepto basófilos), por lo tanto, esta reacción puede usarse para diferenciar las células linfoides o eritroides que son peroxidasa negativas; las células de la serie monocítica presentan una reacción positiva débil o negativa.

### FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA LABORATORIO DE HEMATOLOGÍA “TINCIÓN DE SCHIFF DEL ÁCIDO PERYÓDICO (PAS)”

#### OBJETIVO(S):

Que el alumno aprenda a identificar la reacción tanto positiva como negativa de las células sanguíneas a la tinción de schiff del ácido peryódico (PAS), así como su utilidad en el diagnóstico de enfermedades hematológicas.

#### FUNDAMENTO:

El ácido peryódico oxida los glicoles y los compuestos relacionados con los aldehídos. Los aldehídos pueden entonces reaccionar con el reactivo de Schiff (leuco-fucsina) liberando fucsina y tiñéndose de rojo los componentes celulares que contienen compuestos oxidables. Gran variedad de compuestos intracelulares reaccionan con el reactivo de PAS, pero en las células de la sangre y la médula ósea, el glucógeno es el compuesto principalmente responsable, ya que la tinción puede ser bloqueada por digestión con amilasa. El glucógeno fijado en la célula se observa como un sedimento granuloso aterronado. Localizándose exclusivamente en el citoplasma de las células; la intensidad aumenta a medida que la célula madura.

#### GENERALIDADES:

El ácido peryódico oxida los grupos 1,2 glicol aldehídos. Estos grupos aldehídos combinan con el reactivo de Schiff para dar un producto de color rojo. Los componentes celulares que contienen polisacáridos, mucopolisacáridos y glucoproteínas poseen los grupos 1,2 glicol y se tiñen. La tinción de ácido peryódico de Schiff (PAS) se ve en casi todas las células hematopoyéticas normales. En la línea celular granulocítica, la intensidad de la tinción aumenta con la madurez. Los monocitos exhiben un patrón de tinción difuso mientras que los linfocitos pueden ser negativos o mostrar unos cuantos gránulos positivos a PAS; los megacariocitos y las plaquetas se tiñen de manera intensa, y los eritroblastos normales no se tiñen. Sin embargo, la actividad de PAS es fuertemente positiva en la eritroleucemia (AML\_M6); en esta enfermedad los eritroblastos tempranos exhiben positividad granulosa tosca, pero los eritroblastos de las etapas posteriores exhiben una positividad fina y difusa. Los linfoblastos en la leucemia linfoblástica aguda (L1 y L2) pueden exhibir positividad a PAS, ya sea granulosa áspera o positividad similar a bloque.

TINCIONES CITOQUÍMICAS (PAS)				
TINCIÓN	TIPO DE MUESTRA	COMPONENTES CELULARES TEÑIDOS	ESPECIFICIDAD CELULAR	INTERPRETACIÓN
ACIDO PERYODICO DE SCHIFF	Frotis, impresiones o cortes por congelación o cortes con inclusión en parafina	Glucógeno	Neutrófilos, monocitos, megacariocitos- el grado de positividad varia	Útil en el diagnóstico de eritroleucemia; los eritroblastos muestran fuerte positividad a PAS.

**ERITROLEUCEMIA:** Se aplica este nombre a una proliferación maligna de células eritroides y granulocíticas; si el paciente sobrevive lo suficiente por lo general predomina al elemento leucémico.

El componente eritropoyético generalmente excede el 50% de todas las células nucleadas en la médula ósea. Los eritroblastos muestran, en grado variable, características morfológicas raras, especialmente lobulación múltiple del núcleo con variación de tamaño de los lóbulos, núcleos múltiples, presencia de uno o más fragmentos nucleares, formaciones gigantes y características megaloblásticas. Las células granulopoyéticas muestran una mayor proporción de mieloblastos y promielocitos, y pueden observarse bastones de Auer. El porcentaje de mieloblastos y de promielocitos que acompañan estos cambios diseritropoyéticos es variable, pero cuando es menos del 30% de todas las células nucleadas, se deberá considerar un diagnóstico alternativo tal como el síndrome mielodisplásico.

**LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA:** Excepto por la morfología de las células, y por un aumento del tejido linfoide, esta enfermedad es muy parecida a la LMA en lo que respecta a signos y síntomas, aunque es muy diferente en lo que se refiere a la respuesta al tratamiento y el pronóstico. Ésta puede ser una enfermedad de la CMH linfoide pluripotencial o quizá de una CMH más específica. Algunos pacientes tienen linfoblastos con características antigénicas y de superficie de células T o B maduras, aunque no la mayoría. Sin embargo, la presencia de un antígeno semejante al Ia, sugiere que la mayoría de estas células son del tipo B. La CMH mieloide normal está presente, pero la producción de células maduras se encuentra reducida, lo que se manifiesta por anemia, neutropenia y trombocitopenia en la mayoría de los enfermos. Sin embargo, los linfoblastos leucémicos no reprimen necesariamente la función normal de los linfocitos, porque hasta que los pacientes con LLA reciben tratamiento su sistema inmunitario es casi normal.

Existen tres fármacos que son relativamente específicos para eliminar linfoblastos leucémicos y que por lo general no afectan a las células en su estado normal, incluyendo las CMH normales. De este modo, la inducción de RC con prednisona, u otro glucocorticoide suprarrenal y vincristina, relacionados o no con L-asparaginasa, no necesariamente ocasiona que el paciente se agrave durante el tratamiento. La combinación de estos

fármacos induce RC en más de 90% de los niños con LLA y en un porcentaje ligeramente menor de adultos. Sin embargo, no son útiles como tratamiento de sostén durante la remisión. Para tal propósito, por lo general, se utilizan citotóxicos, como metotrexato y 6-mercaptopurina. Un alto porcentaje de pacientes con LLA tiene focos microscópicos de linfoblastos en las meninges. La barrera hematoencefálica impide la penetración de los fármacos mencionados, exceptuando a la prednisona. Por esta razón, si estos focos no son erradicados con un tratamiento “profiláctico” administrando metotrexato intratecal o radiación craneoespinal, puede presentarse una recaída con leucemia “menígea”, lo que pone fin a la RC en meses (o al cabo de años) por lo menos en la mitad de los casos.

Sin embargo, se puede obtener la curación, aproximadamente en la mitad de los niños con LLA, cuando se induce una RC con un régimen cuidadoso y adecuado; se les administra un tratamiento profiláctico contra la enfermedad meníngea y se les proporciona quimioterapia de mantenimiento durante un periodo regular de 2 o 3 años. Por desgracia, sólo algunos adultos con LLA se han curado empleando este régimen.

La leucemia linfoblástica aguda infantil (llamada también leucemia linfocítica aguda o LLA) es una enfermedad en la que glóbulos blancos que combaten las infecciones (llamados linfocitos) se encuentran inmaduros en grandes cantidades en la sangre y médula ósea del niño. La LLA es la forma más común de leucemia infantil y el tipo más común de cáncer infantil.

Los linfocitos se producen en la médula ósea y en otros órganos del sistema linfático. La médula ósea es el tejido esponjoso que se encuentra dentro de los huesos grandes del cuerpo. Esta produce glóbulos rojos (los cuales transportan oxígeno y otros materiales a todos los tejidos del cuerpo), glóbulos blancos (los cuales combaten las infecciones) y plaquetas (las cuales permiten la coagulación de la sangre). Normalmente, la médula ósea produce células llamadas blastos que se convierten (maduran) en diferentes tipos de glóbulos con funciones específicas en el cuerpo.

El sistema linfático está constituido por tubos delgados que se ramifican, como los vasos sanguíneos, a todas las partes del cuerpo. Los vasos linfáticos transportan linfa, un líquido incoloro y acuoso que contiene linfocitos. A lo largo de la red de vasos se encuentran grupos de órganos pequeños en forma de frijol llamados nódulos linfáticos, y existen conglomerados de nódulos linfáticos en las axilas, la pelvis, el cuello y el abdomen. También forman parte del sistema linfático el bazo (un órgano situado en la parte superior del abdomen que produce linfocitos y filtra los glóbulos deteriorados de la sangre), el timo (un órgano pequeño localizado debajo del esternón) y las amígdalas (un órgano que se encuentra en la garganta).

Los linfocitos combaten la infección produciendo sustancias llamadas anticuerpos, los cuales atacan los gérmenes y otros materiales nocivos que se encuentren en el cuerpo del niño. En la LLA, los linfocitos en desarrollo se vuelven demasiado numerosos y no maduran. Estos linfocitos inmaduros luego se encuentran en la sangre y la médula ósea, y se acumulan en los tejidos linfáticos, haciendo que se hinchen. Los linfocitos pueden desplazar otros glóbulos de la sangre y la médula ósea. Si la médula ósea del niño no puede producir suficientes glóbulos rojos para transportar oxígeno a la sangre, el niño podría

padecer anemia; mientras que si la médula ósea del niño no puede producir suficientes plaquetas para que la sangre se coagule con normalidad, el niño podría padecer de hemorragias o contusiones con facilidad. Los linfocitos cancerosos también pueden invadir otros órganos, la médula espinal y el cerebro.

La leucemia puede ser aguda (que progresa rápidamente con muchas células inmaduras cancerosas) o crónica (que progresa lentamente con células leucémicas de apariencia más madura). La leucemia linfoblástica aguda progresa rápidamente y puede ocurrir en niños y en adultos, aunque el tratamiento es diferente para ambos grupos. Los primeros síntomas de la LLA pueden ser similares a los de la gripe o cualquier otra enfermedad común, incluyendo fiebre que no desaparece, sentirse débil o cansado todo el tiempo, sentir dolor en los huesos o las articulaciones, o tener nódulos linfáticos hinchados. Si los resultados del análisis de sangre no son normales, el médico puede llevar a cabo un aspirado medular. Durante esta biopsia, se inserta una aguja en un hueso de la cadera y se extrae una pequeña cantidad de médula ósea para examinarla a través del microscopio. El médico podrá entonces determinar el tipo de leucemia que el niño padece y planear el mejor tratamiento.

El médico también puede realizar una punción lumbar, en la que se inserta una aguja en la espalda para sacar una muestra del fluido que rodea el cerebro y la espina dorsal. El fluido luego se analiza bajo el microscopio para determinar la presencia de células leucémicas.

La posibilidad de recuperación (pronóstico) de su niño dependerá de la edad del niño, el número de glóbulos blancos que haya en la sangre (recuento de glóbulos blancos) en el momento del diagnóstico, hasta donde se haya diseminado la enfermedad, las características biológicas de las células leucémicas, y de cómo responden dichas células al tratamiento.

No existe un sistema de clasificación específico para la leucemia linfoblástica aguda infantil. El tratamiento dependerá de la edad, los resultados de laboratorio, y si el niño ha recibido tratamiento contra la leucemia con anterioridad o no. Leucemia linfoblástica aguda infantil (LLA) sin tratamiento significa que el paciente no ha recibido tratamiento, excepto para reducir los síntomas. Hay demasiados glóbulos blancos en la sangre y médula ósea, y pueden haber otros signos y síntomas de leucemia. Se ha administrado tratamiento y el número de glóbulos blancos y otros glóbulos y células de la médula ósea es normal. No hay signos o síntomas de leucemia. Enfermedad recurrente significa que la leucemia ha vuelto (recurrido) después de haber estado en remisión. Enfermedad refractaria significa que la leucemia nunca estuvo en etapa de remisión después de haber sido tratada.

#### EQUIPO:

Microscopio

#### MATERIAL:

- a) Biológico: Sangre obtenida con EDTA
- b) De laboratorio: Portaobjetos  
Recipientes de Coplin  
Solución fijadora

Solución de ácido peryódico al 1%  
Reactivo de Schiff  
Hematoxilina de Gill  
Solución de Scott

#### TÉCNICA:

1. Hacer un frotis en portaobjetos de la manera acostumbrada.
2. Secarlos al aire y fijarlos en la solución fijadora de formalina por 2 minutos.
3. Los frotis fijados son lavados con agua corriente.
4. Secar al aire.
5. Los frotis son tratados con ácido peryódico a temperatura ambiente durante 10 minutos y entonces lavados con agua corriente y secados al aire perfectamente.
6. Los frotis son sumergidos en el reactivo de Schiff 20 minutos. Después son lavados con agua corriente.
7. Los núcleos son teñidos por inmersión de las laminillas en hematoxilina de Gill por 5 minutos.
8. Los frotis son lavados con agua corriente.
9. Los frotis se viran en solución de Scott por 1 minuto.
10. Lavar con agua corriente, y secar al aire.
11. Observar con objetivo de inmersión, clasificando 100 células como PAS positivas o negativas. Las células PAS positivas presentan una coloración roja en su citoplasma.

#### INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:

En la sangre normal el citoplasma de los leucocitos polimorfonucleares se tiñe intensamente de color rosa a rojo, con aspecto granular. El citoplasma de los monocitos se tiñe débilmente y los linfocitos pueden presentar pequeños gránulos. Los eritrocitos no se tiñen y las plaquetas se tiñen intensamente.

En la Leucemia Linfoblástica Aguda los blastos presentan gran cantidad de gránulos de color rojizo de tamaño y forma irregular (glucógeno). Los elementos maduros de la serie granulocítica toman la tinción sirviendo de testigos, algunos monocitos y monoblastos pueden presentar positividad a esta tinción, aunque más débil. Es positiva franca en la leucemia M6 con franca morfología de eritroleucemia.

FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA  
LABORATORIO DE HEMATOLOGÍA  
“AUTOMATIZACIÓN EN HEMATOLOGÍA”

**OBJETIVO(S):**

Que el alumno describa el fundamento de los métodos automatizados para el recuento del número y tamaño de células sanguíneas, así como también la diferenciación de las mismas.

**FUNDAMENTO:**

Desde que en 1956 W.H. Coulter diseñó un sistema para contar y medir partículas en combinación con procesos automáticos de dilución (Principio de Coulter), se inició la era de la automatización en hematología. Inicialmente, dichos métodos se limitaban a contar eritrocitos y leucocitos, más adelante se agregó la hemoglobimetría y, con ello, la obtención automática de los índices eritrocitarios. En los últimos años, se ha logrado adicionar el recuento de plaquetas y con otras tecnologías incorporadas, como la citometría de flujo, se puede realizar un recuento diferencial completo.

Obviamente, la automatización ha permitido incrementar enormemente la precisión, la exactitud, la reproducibilidad y la velocidad de proceso de muestras, además de que la información proporcionada es más completa y, por lo tanto, más útil en el diagnóstico hematológico. Por ello, en algunos países no se aceptan recuentos manuales de eritrocitos, dado el coeficiente de variación tan grande que existe en esa metodología.

**GENERALIDADES:**

La automatización está establecida firmemente dentro del laboratorio de hematología y coagulación. La evolución de la instrumentación en hematología se inició a mediados del decenio de 1950. Los profesionales del laboratorio clínico practicaban en ese tiempo manualmente conteos de eritrocitos en el hematocitómetro, hematócrito con centrifugación, hemoglobinas determinadas espectrofotométricamente y exámenes microscópicos de frotis de sangre. Con el advenimiento del primer contador automático simple de células sanguíneas se sustituyeron los conteos manuales de las células sanguíneas en el hemacitómetro para eritrocitos y leucocitos. En general, los contadores automáticos de células sanguíneas proporcionan datos con fiabilidad, precisión y exactitud crecientes.

Con los múltiples avances de la instrumentación en hematología, la automatización cubre actualmente las principales pruebas en el laboratorio de hematología. Puede practicarse un conteo completo de células sanguíneas, incluso la cifra de plaquetas y el diferencial de cinco partes con el uso de instrumentos. En el pasado se han usado varios principios para el conteo celular y el análisis diferencial. Los dos principios del conteo de las células sanguíneas usados por los instrumentos de hematología son la impedancia y la dispersión óptica de la luz.

El principio de la impedancia en el conteo de las células sanguíneas se basa en el aumento de la resistencia producida cuando una célula sanguínea con baja conductividad pasa a través de un campo eléctrico. El número de intermitencias indica la cifra de células sanguíneas, y la amplitud de cada intermitencia es proporcional al volumen de la célula.

Los ejemplos de los instrumentos que usan este principio son el contador Coulter, los instrumentos TOA Sysmex y los instrumentos Abbott Cell-Dyn.

El principio de la dispersión óptica de la luz en el conteo de las células sanguíneas se basa en las mediciones de la dispersión de la luz obtenidas de una sola célula sanguínea que pasa a través de un haz de luz (óptico o láser). Las células sanguíneas crean una dispersión hacia delante y una lateral las cuales se detectan mediante fotodetectores. El grado de dispersión hacia delante es una medición del tamaño de la célula, medición de la complejidad o granularidad de la célula. Este principio se usa por los instrumentos Technicos H System.

## **INSTRUMENTOS DE IMPEDANCIA**

### *CONTADOR COULTER SERIE S-PLUS:*

En 1983 la coulter corporation introdujo el contador Coulter S-plus IV, un analizador automático, multiparametro. El conteo de las células sanguíneas se basaba en el principio Coulter de la impedancia. Estas células eran diluidas en un diluyente conductor eléctrico y dos electrodos estaban suspendidos en esta dilución separados por una abertura. Al pasar las células individuales a través de al abertura hay un aumento en la resistencia entre los dos electrodos proporcional al volumen de la célula. Se establecen límites umbrales para el conteo de cada población de células con base en el volumen celular. Al igual que con los instrumentos Coulter anteriores, había dos cámaras de conteo que operaban simultáneamente. Cada cámara de conteo tiene tres aberturas separadas para efectuar un análisis por triplicado y comparar internamente los resultados con objeto de identificar errores. Los histogramas se crean para las poblaciones de eritrocitos, leucocitos y plaquetas basadas en el volumen celular y número relativo de células. Estos histogramas permiten la observación de las poblaciones de células, su tamaño promedio respecto al resto de la población y su número relativo. Los datos obtenidos a partir de la dilución de eritrocitos/plaquetas incluyen conteo de eritrocitos por medición directa, el volumen corpuscular medio y la amplitud de la distribución del eritrocito.

La computadora analiza los datos obtenidos de la dilución de eritrocitos/plaquetas y de la dilución de los leucocitos. Este instrumento corrige los conteos por coincidencia y evalúa los resultados por triplicado de cada dilución para su reproducción. Si no concuerdan dos o tres resultados, el resultado no se informa sino que se registra como “eliminado”. Los resultados aceptados se promedian y se muestran en el monitor de la computadora o se imprimen en el disco duro para la revisión por parte de los profesionales del laboratorio clínico.

### *CONTADOR COULTER STKS:*

El contador STKS usa una combinación de tecnologías para enumerar eritrocitos, plaquetas y leucocitos y para determinar un conteo diferencial de cinco partes. Se emplea el principio básico de la impedancia para realizar conteos celulares y derivar los histogramas de eritrocitos y plaquetas. El diferencial de cinco partes se determina con tecnología VCD. El instrumento aspira una muestra de sangre con EDTA y la divide en tres porciones. Al igual que con los instrumentos Coulter previos, los conteos de eritrocitos y plaquetas se

determinan dentro de una abertura y los conteos de leucocitos y las determinaciones de la hemoglobina se obtienen por una segunda abertura. Los datos de cada abertura se acumulan y revisan por la computadora. Las cifras de las células, los histogramas, y otros parámetros de los eritrocitos y las plaquetas se envían al sistema de administración de datos. La tercera parte de la muestra de sangre se envía a una cámara de mezcla en donde se prepara una dilución con el uso de una gente lítico que elimina a los eritrocitos, pero conserva a los leucocitos en un estado casi natural. También se agrega un estabilizador para conservar la integridad de los leucocitos. Esta dilución es analizada dentro de la celdilla de flujo del transductor triple para obtener el conteo diferencial de cinco partes. Las células pasan a través de la celdilla de flujo una por una mediante enfoque hidrodinámico. El diagrama de dispersión de DF1 es el diagrama de dispersión bidimensional incluido más comúnmente en el formulario del informe del STKS y muestra datos derivados de los análisis del volumen y la dispersión de la luz. El diagrama de dispersión DF2 muestra datos de los análisis del volumen y de la conductividad. La población basófila, que esta oculta por la población de linfocitos en el diagrama de difusión DF1, se observa en el diagrama de dispersión DF3. Los pueden usar para detectar anomalías o subpoblaciones de células. El sistema de microcomputación analiza y reúne todos los datos obtenidos por el instrumento. Los resultados se muestran en el monitor de la computadora o se imprimen en el disco para revisión por parte de los profesionales del laboratorio clínico.

## **INSTRUMENTOS DE DISPERSIÓN DE LUZ**

### *SISTEMA TECHNICON H\* 1:*

La technicon instruments corporations ha estado implicada en instrumentación de hematología desde principios del decenio de 1970. Los primeros instrumentos se basaron en análisis de flujo continuo similar a sus instrumentos de química. El hemolog D realizaba conteos diferenciales e leucocitos con base en un análisis de flujo continuo y tinción citoquímica con peroxidasa. El technicon H-60000 era capaz de realizar una biometría hemática completa y un conteo capaz de realizar una biometría hemática completa y un conteo diferencial de cinco partes con el uso de un análisis de flujo continuo y un método mejorado de tinción citoquímica. El technicon H\*1 fue el primero de una serie de instrumentos en combinar estos principios de detección de células y la identificación con citometría de flujo.

## **INSTRUMENTOS AUTOMATICOS PARA LA COAGULACION:**

El coaguloviscometro desarrollado por Kottman en 1910 determinó los tiempos de coagulación al medir el cambio en la viscosidad de la sangre conforme se coagulaba. El cambio en la viscosidad se determinaba mediante el registro del voltaje contra el tiempo. Un segundo método para la detección del coagula fue introducido por Kugelmass en 1922, quien adaptó el nefelometro a las pruebas de coagulación. En nefelometría el tiempo de coagulación se determinaba al medir las variaciones en la transiluminación registradas por un galvanómetro.

**EQUIPO:**

Coulter T-890 ubicado en el laboratorio 103.

**MATERIAL:**

Ninguno

**PROCEDIMIENTO:**

Se describirán los principios básicos de operación para el recuento de células, su tamaño y la diferenciación celular por citometría de flujo, los que incluyen volumetría, conductividad y dispersión de la luz láser.

**PRINCIPIOS BÁSICOS DEL RECuento ELECTRÓNICO Y LA MEDICIÓN****EL PRINCIPIO COULTER**

Es un método electrónico para contar y medir partículas de cualquier tipo, lo que es aprovechado en los autoanalizadores hematológicos para contar y medir eritrocitos, leucocitos y plaquetas, así como también en unión de la conductividad y dispersión, para clasificar los leucocitos.

El método cuenta y mide los cambios en la resistencia eléctrica a medida que las células, suspendidas en un líquido conductivo, pasan a través de una pequeña abertura y, al hacerlo, actúan como aisladores eléctricos.

Para poder medir la resistencia eléctrica, se establece un flujo de corriente entre dos electrodos sumergidos en un diluyente electrónicamente conductivo y que se encuentran aislados entre sí: el electrodo interno está encerrado en una cubierta de cristal no conductiva y tiene la abertura que permitirá el paso de células. El electrodo externo se encuentra en el “baño” que rodea al tubo con la abertura. Generalmente, se usan dos baños con diferentes tamaños de abertura de acuerdo con el tamaño de las partículas que se contará; uno para eritrocitos y plaquetas (partículas pequeñas) y el otro para leucocitos (partículas grandes).

La corriente que se mueve del electrodo interno al externo establece el flujo eléctrico a través de la abertura. La suspensión de células en el diluyente es extraída a través de ésta por un suave vacío y al pasar, momentáneamente aumenta la resistencia al flujo eléctrico creándose un pulso que es contado y medido por el instrumento. La cantidad de pulsos contados será proporcional al número de células y su amplitud, o sea el “tamaño” del pulso, está directamente relacionada con el tamaño de la partícula que lo produjo.

**PERIODOS DE RECuento**

La suspensión de células, pasando a través de la abertura de cada baño, es detectada y contada por tres veces separadas. Estos periodos de recuento duran normalmente hasta 4 segundos cada uno, durante este tiempo el analizador colecta y amplifica los pulsos eléctricos producidos por las células. También revisa que hayan sido acumulados datos suficientes para garantizar que las curvas de distribución, por tamaño, reflejen con precisión las poblaciones verdaderas de las células; en caso contrario, automáticamente se extiende el periodo de recuento.

## UMBRALES

Son los límites de tamaño electrónicamente establecidos para una población celular y excluyen del análisis de partículas no deseadas; sólo serán contadas las partículas situadas entre un umbral superior y un inferior, en tanto que las que se encuentren fuera de dichos umbrales serán excluidas.

Los umbrales también permiten distinguir electrónicamente entre dos tipos diferentes de células, por ejemplo, eritrocitos de plaquetas y clasificar las células dentro de una población para producir curvas de distribución o histogramas.

## CORRECCIÓN POR COINCIDENCIA

Ocasionalmente, existe la posibilidad de que más de una célula se pueda encontrar dentro de los límites de detección de una abertura, al mismo tiempo. Si esto sucede, solamente es contado un pulso, lo que podría dar como resultado una cuenta inferior a la real. Para solucionar este problema, se realiza automáticamente una corrección de coincidencia de los resultados, considerando que la frecuencia de coincidencia es una función estadísticamente predecible de la concentración de células.

## RECHAZO DE RECUENTOS

Después de corregida la coincidencia, se comparan los datos de los tres periodos de recuento para verificar que los datos obtenidos concuerden dentro de una escala estadística establecida, en cuyo caso son promediados y reportados. En caso contrario, si no existe concordancia entre los recuentos, los resultados son “rechazados”.

## DILUCIONES

Una válvula muestreadora especial, junto con bombas dispensadoras, realizan las diluciones requeridas. Generalmente, se utilizan dos diluciones para realizar los recuentos:

1. Baño de apertura para eritrocitos/plaquetas: el sistema dispensa 1.8 ml de sangre total y 10 del diluyente, quedando una dilución final de 1:6250. en este baño, se realizan los recuentos de eritrocitos y plaquetas.
2. Baño de apertura para leucocitos/hemoglobina: se dispensan 2.8 ml de sangre total, 6 del diluyente y uno de hemolizante, la dilución final es de 1:251. se realizan el recuento de leucocitos totales y la medición de hemoglobina.

Finalmente, mediante vacío, son drenados ambos baños y de inmediato son lavados con la misma solución diluyente, quedando listos para recibir la siguiente muestra y evitando la contaminación entre muestras.

## HEMOGLOBINOMETRÍA

Se realiza en el baño de leucocitos. Al ser agregado el agente hemolizante a base de cianuro de potasio, a la vez que se lisan y estromalizan los eritrocitos, la hemoglobina liberada es convertida en un pigmento estable cuyo contenido de cianuro puede ser medido fotométricamente. Para ello, es transmitida una luz monocromática de 525 nm a través del

baño de apertura de leucocitos, que tiene integrado un fotómetro. La absorbancia de la muestra es medida y comparada con la lectura del blanco diluyente previamente medido y con un factor de calibración, con lo que se obtiene la concentración de hemoglobina en g/dl. Dado que el agente hemolizante deja intactos a los leucocitos, estos pueden ser contados en el mismo baño.

## CITOMETRÍA DE FLUJO

El elemento clave para la citometría de flujo es la “celda de flujo”. Consiste en una celda a la que se hace pasar por un sistema de ductos, un flujo de la muestra diluida con el mismo diluyente usado en los baños mencionados previamente, adicionando, además, reactivos que permiten conservar a los leucocitos en su estado nativo y que lisen a los eritrocitos para que no interfieran en las mediciones.

Asimismo, a la mitad de la celda, existe una apertura que separa ambos lados de la misma, en los que se sitúan los electrodos interno y externo, para funcionar en forma similar a como lo hacen los baños de apertura. En el momento del paso del flujo de células a través de la apertura, el sistema realiza simultáneamente las mediciones de volumen, conductividad y dispersión de la luz láser. (VCS por sus siglas en inglés).

## MEDICIÓN DE VOLUMEN

Se utiliza el mismo Principio Coulter. Se establece una corriente directa entre los dos electrodos de la celda de flujo, separados por la pared que tiene la apertura. Al pasar los leucocitos por ella, aumentan la resistencia y generan un pulso proporcional a su tamaño.

## MEDICIÓN DE LA CONDUCTIVIDAD

Las paredes de las células son conductivas cuando se exponen a una corriente electromagnética de alta frecuencia. A medida que la corriente pasa a través de la célula, la composición química de su interior, sus gránulos y sus características nucleares ocasionan cambios en la corriente, que son detectados y medidos.

Al momento de su paso por la apertura, la célula recibe la onda electromagnética de alta frecuencia y en el lado opuesto, a manera de “pantalla”, se mide el cambio de corriente sufrido al atravesar la célula.

La conductividad ayuda a diferenciar las células de tamaño similar pero de composición diferente, como los linfocitos pequeños y los basófilos, que podrían aparecer como una sola población si se midiera únicamente el volumen. Al agregar la medición de conductividad, se detectarán marcadas diferencias en la relación núcleo/citoplasma y la granularidad, permitiendo entonces distinguir las dos poblaciones celulares.

## MEDICIÓN DE LA DISPERSIÓN DE LA LUZ

Al mismo tiempo, en el paso por la apertura, en el otro eje lateral, las células reciben un haz monocromático de una fuente láser. Al atravesarla, la luz sufrirá una dispersión que principalmente dependerá del tipo y número de gránulos presentes en el citoplasma.

La medición de la dispersión ocasionada proporciona información acerca de la estructura, forma y reflectividad. Cuando se combina esta información con la obtenida en las

mediciones volumétrica y de conductividad, se obtiene una clasificación de las células con una muy alta resolución, misma que se incrementa con el hecho de que, a diferencia del recuento diferencial manual en el que se cuentan 100 células, en la citometría de flujo se cuentan por lo menos 7000.

### HISTOGRAMAS DE DISPERSIÓN DEL VCS

Los datos colectados en las miles de células analizadas por las tres tecnologías del VCS proporcionan información específica para cada tipo de célula y al hacerse simultáneamente permiten que el sistema haga una gráfica tridimensional de poblaciones y subpoblaciones celulares, en la que un eje ubica el volumen, en otro, la conductividad y en el tercero, la dispersión de la luz láser. Como cada eje cuenta con 256 posiciones, la capacidad total de dicha gráfica es de más de 16 millones, lo que le da una gran precisión en la clasificación de células.

Finalmente, el mismo sistema hace el recuento porcentual de cada población de células, y al considerar la cifra total de leucocitos le permite reportar cada tipo de leucocito en cifras porcentuales y absolutas.

### DERIVACIÓN DE PARÁMETROS

#### RECUESTO DE ERITROCITOS:

Es un parámetro medido directamente en su propio baño de apertura. La dilución que llega a este baño contiene eritrocitos, leucocitos y plaquetas. Los umbrales son utilizados para separar los pulsos de las plaquetas, que son muy pequeños, comparados con los demás. Las partículas mayores de 36 fl son contadas como eritrocitos siendo incluidos, en el recuento, los leucocitos. No obstante, su interferencia es insignificante debido a que son solo unos pocos miles en comparación con los millones de eritrocitos.

#### HISTOGRAMA DE ERITROCITOS:

Además de ser contados, los eritrocitos son jerarquizados de acuerdo con su tamaño, obtenido de la altura de los pulsos, en 256 categorías de tamaño; genera un histograma de las partículas.

#### VOLUMEN GLOBULAR MEDIO:

Es el promedio en el tamaño de los eritrocitos incluidos en el histograma, desde luego que el promedio es obtenido después de la corrección por coincidencia. A diferencia de los métodos manuales, en equipos automatizados el volumen globular medio es un parámetro medido y no calculado, por lo que tiene significativamente mayor valor en la clasificación morfológica de las anemias.

#### ANCHO DE DISTRIBUCIÓN ERITROCITARIA (ADE):

Es una medida de la variabilidad en el tamaño de los eritrocitos (anisocitosis) y es derivado del histograma de eritrocitos. En realidad, es el coeficiente de variación del volumen globular medio y es obtenido calculando la desviación estándar y la media de la población eritrocitaria para aplicar después la siguiente fórmula:

$$ADE = \frac{\text{Desviación estándar}}{\text{Media}} \times 100$$

## Media

### HEMATÓCRITO:

Es el volumen relativo de los eritrocitos, expresado como porcentaje; es calculado de la siguiente manera:

$$\text{Hematócrito} = \frac{\text{Eritrocitos} \times \text{Volumen Globular Medio}}{10}$$

### CONCENTRACIÓN DE HEMOGLOBINA:

Es un parámetro medido en forma directa, en el baño de leucocitos. Al agregarse el reactivo lítico a la dilución de leucocitos, los eritrocitos se lisan y la hemoglobina liberada se transforma en un pigmento estable cuyo contenido de cianuro es medido fotométricamente a 525 nm y la absorbancia es comparada a una lectura del blanco de diluyente y un factor de calibración previamente obtenido.

### HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MEDIA:

Indica el peso promedio de la hemoglobina en el eritrocito, es calculada de la siguiente manera:

$$\text{HC} = \frac{\text{Hemoglobina} \times 10}{\text{Eritrocitos}}$$

### CONCENTRACIÓN MEDIA DE HEMOGLOBINA GLOBULAR:

Es una expresión de la concentración promedio de la hemoglobina en los eritrocitos. Relaciona la cantidad promedio (peso) de la hemoglobina en los eritrocitos con el volumen promedio de los mismos. Se calcula así:

$$\text{CMHG} = \frac{\text{Hemoglobina} \times 100}{\text{Hematócrito}}$$

### RECUESTO DE LEUCOCITOS:

Es medido directamente en su propio baño de apertura. El analizador cuenta como leucocito a todas las partículas, en la dilución de leucocitos, que son mayores de 36 fl. Aunque los eritrocitos son de tamaño similar, han sido eliminados con el reactivo lítico. Las plaquetas, por ser de menor tamaño del umbral 36 fl, son ignoradas en el recuento.

### RECUESTO DE PLAQUETAS:

Son medidas directamente en el baño de eritrocitos mediante el recuento de partículas, ubicadas dentro del umbral de 2 a 20 fl. Al igual que en el recuento de eritrocitos, se realiza un histograma con el número y tamaño de las plaquetas.

### VOLUMEN PLAQUETARIO MEDIO:

Es el promedio en el tamaño de las plaquetas y es obtenido de su histograma.

### RECUESTO DIFERENCIAL DE LEUCOCITOS:

Se realiza en la celda de flujo. A cada leucocito que pasa por la apertura se le mide volumen, conductividad y dispersión de luz láser (VCS). Los datos son registrados

tridimensionalmente en histogramas, con lo que las poblaciones celulares son identificadas y se obtienen las cifras porcentuales de neutrófilos, basófilos, eosinófilos, linfocitos y monocitos. El número absoluto de cada una de ellas por  $\text{mm}^3$  de sangre es calculado multiplicando el porcentaje obtenido en el recuento por el total de leucocitos obtenido en la cuenta directa de ellos.

**ANEXO 06****PREPARACIÓN DE REACTIVOS**

## 1. SOLUCIÓN DE GOWER:

Sulfato de sodio. .... 12.5 g  
Ácido acético glacial ..... 33.3 g  
Agua destilada ..... 200 ml

## 2. DILUYENTE DE DRABKIN (CIANOMETA):

Bicarbonato sódico. .... 1 g  
Cianuro potásico..... 0.05g  
Ferricianuro potásico..... 0.2 g  
Agua destilada c.b.p. .... 1,000ml

## 3. SOLUCIÓN PATRÓN DE HEMOGLOBINA HYCEL O ACUNGLOBÍN DE 60mg/dl.

## 4. REACTIVO PARA RETICULOCITOS:

A) Solución de citrato salino al 0.4%:

$\text{Na}_3 \text{C}_6 \text{H}_5 \text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2 \text{O}$  ..... 0.1 G

NaCl..... 0.225 g

Agua destilada ..... 25.0 ml

Mezclar hasta disolver completamente las sales.

B) Solución colorante de azul de cresilo brillante al 1%

Azul de cresilo brillante..... 0.25 g

Solución de citrato salino al 0.4%. .. 25.0 ml

Disolver, filtrar y conservar en un frasco gotero ámbar.

## 5. METABISULFITO DE SODIO AL 2% :

Metabisulfito de sodio ..... 0.2 g

Agua destilada c.b.p..... 10 ml

## 6. SOLUCIÓN SALINA AL 1% TAMPONADA, PH 7.4:

Se prepara disolviendo 9 gramos de cloruro de sodio, 1.36 gramos de  $\text{Na}_2 \text{HPO}_4$  y 0.187 gramos de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  en un litro de agua destilada.

7. REACTIVOS PARA LA DETECCIÓN DE DEFICIENCIA DE GLUCOSA 6-FOSFATO DESHIDROGENASA:

A) Sol. De nitrito de sodio-dextrosa:

Dextrosa..... 5.0 g  
 NaNO<sub>2</sub>..... 1.25 g  
 Agua destilada ..... 100 ml

B) Sol. De azul de nilo:

Azul de nilo ..... 22 mg  
 Agua destilada ..... 100 ml

C) Reactivo combinado:

Mezclar en partes iguales sol. A + sol. B

D) Anticoagulante ACD:

Ácido cítrico ..... 0.80 g  
 Citrato de sodio, sal trisódica .. 2.20 g  
 Dextrosa..... 2.45 g  
 Agua destilada c.b.p..... 100 ml

8. REACTIVOS PARA LA OBSERVACIÓN DE CUERPOS DE HEINZ:

Buffer de fosfatos 0.067M, Ph 7.6 la cual se prepara de la sig. Manera:

a) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.067M

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>..... 9.08 g  
 Agua destilada ..... 1000 ml

b) Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub> anhidro 0.067 M

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> anhidro..... 9.47 g  
 Agua destilada ..... 1000 ml

Mezclar 1.3 partes de solución (a) y 8.8 partes de solución (b) para obtener 100 ml ó múltiplos. Inmediatamente antes de usar agregar 200 mg de glucosa a 100 ml de buffer.

Solución de acetilfenilhidrazina, la cual se prepara:

Acetilfenilhidrazina en polvo. .... 100 mg  
 Buffer de fosfatos ..... 100 ml

Esta solución debe prepararse fresca y usarse antes de una hora.

Solución de cristal violeta, la cual se prepara:

Cristal violeta ..... 2 g  
 Solución de NaCl al 0.73% ..... 100ml

Agitar la solución durante 5 minutos y filtrar. Mezclar el filtrado con igual cantidad de solución de NaCl al 0.73%.

## 9. SOLUCIÓN SATURADA DE SULFATO DE AMONIO AL 50%:

Sulfato de amonio..... 500 g  
Agua destilada .....500 ml  
Ácido clorhídrico 10N ..... 2.0 ml

Calentar primero el agua a ebullición, entonces agregar el sulfato de amonio mezclando hasta saturación. Dejar enfriar. Tomar 400 ml del sobrenadante y diluirlos con 400 ml de agua destilada. Agregar el ácido clorhídrico 10 N.

## 10. HIDRÓXIDO DE POTASIO N/12 :

Hidróxido de potasio .....4.75 g  
Agua destilada ..... 1000 ml

## 11. AMORTIGUADOR DE TRIS BARBITAL PARA ELECTROFORESIS “Helena”, pH 8.9 :

Amortiguador Supra Heme  
“Helena Lbs” ( cat. 5802) ..... un sobre  
Agua destilada c.b.p.....1000 ml

Disolver el contenido de un sobre del amortiguador en el agua destilada. Agregar 0.5 ml de merthiolate blanco para conservarlo. Guardar en refrigeración en frasco ámbar.

## 12. SOLUCIÓN COLORANTE PONCEAU-S:

Ponceau S .....0.5 g  
Ácido tricloroacético al 5%..100 ml

## 13. ÁCIDO ACÉTICO AL 20% EN METANOL.:

Ácido acético q.p. .... 20.0 ml  
Metanol q.p..... 80.0 ml

## 14. LÍQUIDO DILUYENTE TURK:

Ácido acético glacial .....3 ml  
Solución acuosa de azul de metileno o violeta de genciana al 1%..... 1 ml  
Agua destilada c.s.p. .... 100 ml

## 15. AMORTIGUADOR DE FOSFATOS pH 6.4 :

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> anhidro .....	3.31 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> anhidro.....	1.28 g
Agua destilada c.b.p.....	500 ml

Comprobar el pH con un potenciómetro.

También se puede preparar de la siguiente manera:

Disolver 9.47 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> en un litro de agua destilada (solución A) y disolver 9.08 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> en un litro de agua destilada (solución B). Mezclar 434 ml de la solución A y 566 ml de la solución B.

## 16. COLORANTE DE WRIGHT:

Colorante de wright en polvo .....	0.3 g
Metanol.....	150 ml

En un mortero colocar el colorante y agregar metanol en pequeñas porciones triturando el polvo con el metanol; vaciar poco a poco en un recipiente hasta acabar el metanol. Dejar madurar durante 10 días, con agitación.

Otra manera de preparar el colorantes es triturando en un mortero 3 gramos de colorante de Wright y agregarle un poco de glicerina hasta formar una pasta.

Agregar poco a poco un litro de metanol disolviendo perfectamente todo el colorante; una vez disuelto colocarlo en baño de agua a 37<sup>0</sup>C durante 24 horas.

Filtrar antes de usarlo.

## 17. LÍQUIDO DE DUNGER:

Eosina amarillenta al 2% en agua.....	0.5 ml
Acetona.....	1.5 ml
Agua destilada c.b.p.....	10 ml

Esta solución puede guardarse en el refrigerador hasta 2 semanas; al cabo de este tiempo deberá desecharse.

## 18. REACTIVOS PARA LA TINCIÓN CITOQUÍMICA DE MIELOPEROXIDASA (PEROXIDASA LEUCOCITARIA):

## 1. Solución fijadora:

Formol al 37% .....	10 ml
Etanol absoluto. ....	90 ml

## 2. Solución colorante:

Etanol al 30% (v/v en agua).....	100 ml
Dihidrocloruro de bencidina.....	0.3 g
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O al 3.8 % .....	1 ml
Acetato de sodio 3H <sub>2</sub> O .....	1 g

Peróxido de hidrógeno al 3%. .....0.7 ml  
 Hidróxido de sodio 1.0 N ..... 1.5 ml  
 Safranina..... 0.2 g

Los reactivos se mezclan en el orden indicado. La bencidina a veces contiene un material insoluble. Al añadir el sulfato de zinc se forma un precipitado que se disuelve al añadir los demás reactivos. El pH de la solución debe ajustarse a 6.00 +/- 0.05. La solución se filtra y se guarda a temperatura ambiente; puede usarse de manera repetida por meses.

#### 19. REACTIVOS PARA LA TINCIÓN CITOQUÍMICA DE SCHIFF DEL ÁCIDO PERYÓDICO (PAS):

##### 1. Solución fijadora:

Formol al 37%. ..... 10 ml  
 Etanol..... 90 ml

##### 2. Solución del ácido peryódico al 1%:

Ácido peryódico. .... 1 g  
 Agua destilada ..... 100 ml

##### 3. Reactivo de Schiff:

Pararosanilina ..... 1 g  
 Ácido clorhídrico 1N ..... 20 ml  
 NaHSO<sub>3</sub> ó Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>..... 1 g  
 Carbón activado..... 0.5 g

Ponga 200 ml de agua destilada a calentar. Cuando llegue a 96<sup>0</sup>C, se retira del calor y se agrega 1 g de pararosanilina, se vuelve a colocar en la fuente de calor hasta que hierva, pero evitando el burbujeo violento, se deja enfriar hasta que alcanza aprox. Los 50<sup>0</sup>C y se agregan 20 ml de ácido clorhídrico 1N. Ya totalmente frío se añade 1 g de metabisulfito de sodio y se agita hasta que se disuelva. Se coloca en un frasco cerrado en un lugar oscuro por 48 horas. El reactivo debe de quedar de color paja después de 48 horas. A continuación se agrega 0.5 g de carbón vegetal o activado y se agita por 10 segundos y se filtra. Si no quedara totalmente transparente, repetir la operación. Se guarda en el refrigerador.

##### 4. Hematoxilina de Gill:

Etilén glicol .....250 ml  
 Hematoxilina monohidratada ..... 2 g  
 Yodato de sodio..... 0.2 g  
 Sulfato de aluminio..... 17.6 g  
 Ácido acético glacial ..... 2 ml  
 Agua destilada ..... 730 ml

Se mezcla el agua destilada con el etilén glicol con agitación continua. Se agrega la hematoxilina, se agita hasta que se disuelve totalmente. Luego se agrega el yodato de sodio, se agita hasta que se disuelve totalmente. Después se agrega el sulfato de aluminio y se agita.

Se deja agitando esta mezcla durante 2 horas y posteriormente se añade el ácido acético glacial. Se filtra y está lista para usarse, aunque con el tiempo madura y tiñe mejor. Cuando la solución es muy nueva hay que dar más tiempo de tinción del indicado por la técnica.

5. Solución de Scott:

Agua corriente ..... 1000 ml  
 Sulfato de magnesio anhidro. .... 10 g ( si es hidratado 20 g)  
 Bicarbonato de sodio. .... 2 g

Mezclar los ingredientes en el orden indicado.

20. REACTIVOS PARA LA TINCIÓN CITOQUIMICA DE SUDÁN NEGRO B.

Solución de Sudán Negro B: Se disuelven 300 mg de Sudán Negro B en 100 ml de etanol al 96%.

Solución tamponada\_ Se mezclan 16 g de fenol con 30 ml de alcohol etílico absoluto y se añaden a una solución de 0.3 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  en 100 ml de agua destilada.

Solución colorante: Mezclar 60 ml de solución de Sudán Negro B con 40 ml de solución tamponada. Filtrar.

21. REACTIVOS PARA LA TINCIÓN CITOQUÍMICA DE FOSFATASA  
 ALCALINA LEUCOCITARIA:

Reactivo A (fijación): 27 ml de formaldehído al 37% y 73ml de metanol.

Reactivo B (solución de trabajo):

Propanodiol..... 10.5 g  
 Agua destilada .....25.0 ml  
 HCl 0.1 N..... 5.0 ml  
 Agua destilada c.s.p. .... 100 ml

Mezcla de tinción:

Solución de trabajo ..... 50.0 ml  
 Naftol ASBI fosfato. .... 100.0 mg

Agregar:

Solución de trabajo. .... 50.0 ml  
 Fast blue RR.....100.0 mg

Filtrar y usar.

Reactivo C: Hematoxilina

22. SOLUCIÓN DE OXALATO DE AMONIO AL 1%.  
Oxalato de amonio..... 1.0 g  
Agua destilada c.b.p.....100 ml  
Azul de metileno..... 0.2 ml  
Filtrar y conservar en refrigeración. Filtrar con frecuencia. Se debe desechar en cuanto aparece turbidez.
23. TROMBOPLASTINA DE CEREBRO DE CONEJO CON CLORURO DE CALCIO (Simplastin Excel, Organon Teknika; Thromboplastin.C. Dade/Baxter; Thromborel S; Behring; Thrombomat, Biomerieux).
24. TROMBOPLASTINA HÍSTICA ADICIONADA DE SOL. DE CLORURO DE CALCIO 0.02 M, LIOFILIZADA.
25. TROMBOPLASTINA PARCIAL LÍQUIDA ACTIVADA (Platelin; Organon Teknika; Automated APTT, Organon Teknika; Actin, Dade/Baxter; Pathromtin, Behring; Silimat; Biomerieux).
26. TROMBOPLASTINA PARCIAL LÍQUIDA ACTIVADA.
27. CLORURO DE CALCIO 0.02 M:  
Cloruro de calcio anhidro ..... 1.11 g  
Agua destilada c.b.p.....500 ml
28. TROMBINA HUMANA DE 3 A 5 U/ml ( Thromboquik, Organon Teknika; Test-Trombin, Thrombin Clotting Reagent, Dade/Baxter. Behring; Thrombicalcitest, Biomerieux).
29. FIB 20 (100 NIH).
30. BUFFER DE DILUCIÓN (IBS).
31. TT (10 NIH/Vial).
32. CALIBRADORES PARA PLASMA NORMAL DE REFERENCIA PARA HEMOSTASIS.

33. CONTROLES PARA PLASMA HUMANO: NORMAL, ANORMAL NIVEL SUPERIOR Y ANORMAL NIVEL INFERIOR.
34. TROMBINA HUMANA DE 5000 U/ml ( Frindex, Ortho):  
Solución madre de trombina de 50 U/ml:  
    Trombina humana 5000 U/ml ..... 1.0 ml  
    Solución salina isotónica c.b.p. .... 100 ml  
Solución de trabajo de trombina de 5 U/ml:  
    Solución madre de trombina..... 1.0 ml  
    Solución salina isotónica c.b.p. .... 10 ml
35. TROMBINA CÁLCICA LIOFILIZADA (FIBRI-TEST).
36. REACTIVO DE TROMBINA DE 100 U.INH/ml DE TROMBINA (Fibriquick, Organon Teknika; Referencia para calibración de fibrinógeno, Dade/Baxter; Multifibren Test, Behring; Fibrinomat, Biomerieux).
37. PATRÓN DE REFERENCIA DE FIBRINÓGENO DE 200 mg/dl (Fibriquick, Organon Teknika; Referencia para calibración de fibrinógeno, Dade/Baxter; Multifibren Test, Behring; Fibrinomat, Biomerieux).
38. AMORTIGUADOR DE VERONAL DE OWREN (barbital sódico 0.028 M; pH 7.35) ( Fibriquick, Organon Teknika; Referencia para calibración de fibrinógeno; Dade/Baxter; Multifibren Test, Behring; Fibrinomat, Biomerieux).  
    Dietyl Barbiturato de sodio. .... 11.75 g  
    Cloruro de sodio. .... 14.67 g  
    Ácido clorhídrico 0.1 N. .... 400 ml  
    Agua destilada c.b.p. .... 2000 ml