

24.27



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Escuela Nacional de Estudios Profesionales
"ZARAGOZA"

PRUEBAS DIFERENCIALES Y PRONOSTICAS EN
UN GRUPO DE NIÑOS CON ANEMIA APLASTICA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

CARMEN MELCHOR DIAZ

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

México, D. F.

Junio 1988



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

INTRODUCCION

Capítulo	Página
I. GENERALIDADES.....	2
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	11
Planteamiento del problema.....	12
Objetivos.....	13
Hipótesis.....	14
III. PARTE EXPERIMENTAL.....	15
Recursos.....	16
Material.....	16
Equipo.....	17
Material Biológico.....	18
Reactivos.....	19
Métodos.....	20
Prueba de hemólisis de Inulina.....	20
Prueba de hemólisis Ácida.....	21
Prueba de hemólisis con Sacarosa.....	25
Prueba de la hemoglobina fetal.....	27
Prueba de la hemosiderina.....	30
IV. RESULTADOS.....	32
Tablas y gráficas.....	35
Análisis de resultados.....	52
V. CONCLUSIONES.....	56
Conclusiones.....	57
BIBLIOGRAFIA.....	59

APENDICE A.....	66
Preparación de reactivos.....	66
a) PRUEBA DE LA SACAROSA	
1. Preparación del amortiguador de fosfatos (PBS); pH; 7.2-7.4.....	66
2. Solución de Sacarosa al 9.2%.....	66
b) PRUEBA DE LA INULINA	
1. Preparación de la Inulina al 0.1%.....	67
c) PRUEBA DE LA HEMOLISIS ACIDA	
1. Solución de L-císteina al 10%.....	67
d) PRUEBA DE LA HEMOGLOBINA FETAL	
1. Sulfato de amonio saturado al 50%.....	67
2. Sulfato de amonio saturado al 50% ácido (HCl).....	68
e) PRUEBA DE LA HEMOSIDERINA	
1. Reactivo de Azul de Prusia.....	68
2. Solución de Safranina al 0.1%.....	69
f) PREPARACION DEL MATERIAL LIBRE DE HIERRO....	69

I N T R O D U C C I O N

La anemia aplásica adquirida es una afección poco frecuente en pediatría, y que se acompaña de un alto riesgo de mortalidad, es definida como una enfermedad que se caracteriza por una pancitopenia en sangre periférica, hipocelularidad variable de médula ósea o bien ausencia de células.

Por otra parte la hemoglobinuria paroxística nocturna es una enfermedad clonal rara de hematopoyesis, la cual afecta primordialmente a las células rojas maduras; en ambas enfermedades la hipocelularidad es característica que las asocia; sin embargo la relación clínica entre estas dos enfermedades aún permanece oscura.

Debido a la similitud clínica entre estas dos enfermedades se procedió a investigar en nuestra población pediátrica la posibilidad de que se presentase una hemoglobinuria paroxística nocturna entre los nacientes diagnosticados como anemia aplásica, utilizando pruebas de laboratorio en donde se someten los eritrocitos a la acción lítica mediada por el complemento: y al mismo tiempo obtener datos de pronósticos favorable para la anemia aplásica en la población infantil de este centro.

CAPITULO I

G E N E R A L I D A D E S

La anemia aplástica fue descrita por vez primera por Paul Ehrlich en 1888; cuando publicó el caso de una muchacha de 21 años de edad que había fallecido de una anemia grave y neutropenia y que en el examen necrópsico se encontró que presentaba médula ósea hipocelular amarilla. (1)

Para muchas áreas del mundo los datos epidemiológicos acerca de la anemia aplástica son escasos o no existen, sin embargo es conocido que en los países asiáticos y en algunos países de Latinoamérica es mayor la incidencia. Se han realizado estudios que demuestran que la anemia aplástica es también muy prevalente en México, esto es en parte, por los factores genéticos hereditarios de los mexicanos con el indígena de origen asiático. Se ha considerado que el relativo porcentaje de incidencia en japoneses, coreanos y mexicanos puede reflejar una susceptibilidad racial genéticamente determinada. Así pues, mientras en Suiza la mayoría de los casos de anemia aplástica, ocurren en personas mayores de 50 años, esta enfermedad en Asia y México ocurre predominantemente en la edad adulta, sin embargo se ha encontrado que 1, 000 niños hospitalizados por 48 horas o más en 4 hospitales pediátricos de la ciudad de México tienen anemia aplástica.(2,3)

En un estudio similar realizado en los hospitales pediátricos equivalentes en Argentina, Chile, Venezuela y Costa Rica, cuya población, posee un componente indígena menor que el de la pobla

ción de México o Perú, el índice fue de 0,12-0,56 por 1, 000 internamientos. Por otra parte los estudios realizados en México, pueden ser puestos dentro de las perspectivas por comparación -- con un estudio a gran escala interinstitucional, llevado a cabo en los 37 centros médicos principales de los U.S.A., Inglaterra y Sudafrica; en los que se observó un aumento de 110 casos en 4-años; además de que el estudio realizado por la cooperativa para el estudio de la anemia aplástica, junto con los 352 casos de--- los 30 principales centros médicos de Europa, permiten establecer tal comparación, donde se observó que en México hay predominio de pacientes más jóvenes que en los casos europeos. (las edades medias fueron 40.3 y 47 años en las 2 series estudiadas recientemente en México) (3)

La anemia aplástica es una enfermedad con un alto porcentaje de mortalidad. Estudios hechos por A. Hörman y colaboradores(4) en un grupo de pacientes a quienes evaluaron hasta su muerte por un período aproximado de 4 años, obtuvieron como resultado las-- curvas de supervivencia que muestran una figura bifásica con un paso inicial que declina hasta cerca de 3-6 meses después de iniciada la enfermedad. Los resultados sugieren la existencia de-- formas diferentes de anemia aplástica: una severa de curso fatal y rápido, y una moderada que se extiende durante muchos meses o aún años con una baja mortalidad o finalmente supervivencia.

Entre los agentes físicos o químicos agresores de la médula-- ósea, se pueden establecer dos grupos: los que causan un daño---

intrínseco, relacionado con la dosis y los que causan un daño extrínseco, que aparece sin relación con la dosis. (5)

Dentro de los agentes principales del primer grupo se encuentran: rayos X, sustancias radioactivas, principalmente emisoras de rayos gamma.

El segundo grupo es mas numeroso. Su efecto depresor hematopoyético no esta relacionado con la sustancia en sí, ni con la dosis; su efecto adverso depende ampliamente de la constitución del individuo. Existe una susceptibilidad individual a estos agentes cualquiera que sea su naturaleza. Este grupo lo forman sustancias antibacterianas, antiparasitarias, anticonvulsivantes antitiroideas, antidiabéticas, antiinflamatorias, antihistamínicas, psicotrópicas, diuréticas y otro tipo de agentes terapéuticos, junto con insecticidas, solventes, metales, virus y bacterias; que poseen una actividad depresora hematopoyética extrínseca, dando lugar a fallas hematopoyéticas tales como: disminución del número de células madre hematopoyética normales, células madre hematopoyética anormales, disminución de la capacidad de autorenovación, balance anormal de replicación y diferenciación; inhibición de modificación de la célula madre hematopoyética normal, microambiente anormal de la médula ósea, falta de cofactores hematopoyéticos humorales y celulares. (6)

Es interesante notar que en países como Japón, Corea, Taiwan y México existe una facilidad en la industria para tener contacto con benceno o derivados, así mismo en estos países hay muy po

co esfuerzo por proteger a los trabajadores industriales de los riesgos de trabajo al contacto con los insecticidas tales como el D.D.T., paratión y malatión que se aplican sobre vastas regiones de Corea y México para el control de mosquitos y otros insectos, sin tener ningún control en su uso.

El cloranfenicol y otras toxinas que afectan a la médula ósea son entre otros la causa de la anemia aplástica. En México y -- Taiwan el cloranfenicol, puede comprarse irrestringidamente sin prescripción médica; se ha observado que el cloranfenicol es la causa más probable de anemia aplástica en aproximadamente el 50% de los casos japoneses, mientras que en México, lo es el uso de insecticidas (D.D.T.) y benceno. El cloranfenicol parece ser --- una causa poco frecuente de anemia aplástica en México, ésto es una sorpresa en vista de su amplio e irrestringido uso, se han -- hecho revisiones cuidadosas de historias médicas, visita a casa de pacientes por trabajadoras sociales, examinación de botiquines de los mismos, entrevistas a médicos particulares a los que acuden; llegando a la conclusión de que el cloranfenicol no es -- la causa más común de la anemia aplástica en México. (3)

Aproximadamente 0.3 a 5.0% de casos de anemia aplástica, son secundarios a hepatitis (generalmente no A no B) sin embargo, -- cerca del 25% de los pacientes con esta enfermedad tienen anomalías funcionales hepáticas en el diagnóstico clínico; posible -- mente reflejan infección subclínica a exposición a una droga he-

patotóxica.

La hepatitis precedente de una aplasia de médula no es por lo general severa, sin embargo, una hepatitis posterior a una anemia aplástica tiene un pobre pronóstico. (7)

Existe muy poca información reciente sobre la asociación entre la hepatitis viral y la post-hepatitis-anemia aplástica, algunos factores clínicos han sido delimitados y se ha reconocido una alta mortalidad (cerca del 88%) (8)

Otras infecciones asociadas en forma secundaria con anemia--aplástica son la mononucleosis infecciosa, dengue, influenza y--brucelosis. (9)

La anemia aplástica severa la cual puede ser fatal ha sido---vista durante largo tiempo como un fenómeno raro e ideosincrático.

Las características generales, involucradas para el diagnóstico de anemia aplástica en sangre periférica y médula ósea cursan con una pancitopenia severa (leucopenia, trombopenia y reticulopenia). Los eritrocitos de estos pacientes presentan morfología y funcionalidad aparentemente normales, en ocasiones son macrocíticos.

La médula ósea aparece hipocelular, pero puede cursar con una hipercelularidad aparente, con aumento de la grasa medular y también células del estroma (linfocitos, células plásmáticas y mas-

locitos), ésto es observable también en biopsia de hueso.

En algunas ocasiones la punción puede recaer sobre algunos islotes de celularidad conservada y entonces el diagnóstico puede ser difícil, puede entonces recurrirse a la biopsia de hueso que es más aproximativa para la evaluación de la celularidad de la médula. En el mielograma debe observarse su arquitectura, fibrina, células plásmáticas y linfoides "infiltrados", osteoporosis y reticulina que están presentes en 25 al 50% de pacientes con anemia aplástica.

El hierro sérico está aumentado, con el coeficiente de saturación también elevado.

Es interesante pero está todavía por explicarse, el hallazgo ocasional de una tasa elevada de hemoglobina fetal. Estudios--- realizados por Bloom y colaboradores (10) indican que la concentración de la hemoglobina fetal está relacionada con la severidad de la anemia aplástica y puede ser un valor pronóstico en la mayoría de los pacientes con esta enfermedad, ya que los resultados obtenidos por ellos sugieren que un alto nivel de hemoglobina fetal es de buen pronóstico.

Por otra parte el pronóstico de pacientes con anemia aplástica ha sido estudiado en relación a la rapidez del inicio, edad, sexo, reticulopenia, anemia, volumen corpuscular medio, neutropenia, celularidad de la médula, anormalidades ultraestructurales de la médula ósea, ferrocínética, y resultado de los escrutinios

de la médula ósea.

El grupo internacional utiliza cuatro criterios para definir una anemia aplástica severa: en sangre periférica.- un número menor de neutrófilos de $500/\text{mm}^3$, plaquetas menores de $20\ 000/\text{mm}^3$ y reticulocitos (corregidos) menores al 1%. En médula ósea:--- hipocelularidad severa y moderada menor al 30% de células precursoras hematopoyéticas. (7); existe cierta arbitrariedad en el uso de estos criterios estandar, debido a la facilidad de comparación de los parámetros en estudio. Además estudios hechos por la cooperativa europea correlacionan el pronóstico de la enfermedad con las condiciones del paciente en los primeros tres meses de iniciada la enfermedad, el reposo suficientemente adecuado del paciente durante este tiempo así como una recuperación hematológica adecuada durante el mismo sugieren que los pacientes con anemia aplástica tendrán un buen pronóstico.

Nuevos descubrimientos terapéuticos para el tratamiento de la anemia aplástica han emergido, sumándose a la terapia convencional con andrógenos; por lo que el litio y recientemente el trasplante de médula ósea allogénica ofrecen la oportunidad de una recuperación completa siempre que se cuente con un donador con HLA similar disponible, según estudios realizados por C. Hershko y colaboradores. (11)

Para la selección del método terapéutico más apropiado, se requiere de factores de pronóstico reales.

Ante un caso de aplasia medular es conveniente descartar la posibilidad de que se trate de un tipo de anemia hemolítica como es la Hemoglobinuria Paroxística Nocturna (HPN), sobre todo si existe una pancitopenia aparente, ya que esta enfermedad (HPN) clínicamente es similar o cursa como una anemia aplásica con las siguientes características: leucopenia y trombocitopenia con o sin reticulocitosis que se distingue por episodios espontáneos de hemólisis intravascular dando lugar a un aumento de la hemoglobina libre y disminución de haptoglobinas; presencia de hemo-siderina y de hemoglobinuria. La hemólisis se presenta con mayor frecuencia durante las noches, siendo relacionada a la relativa acidosis que ocurre durante el sueño, provocando un incremento en la sensibilidad de los eritrocitos a la lisis mediada por el complemento. Esta susceptibilidad se cree que es por defecto de la membrana del eritrocito, el cuál aún permanece desconocido.

Estudios realizados por Dessypris y colaboradores (13) quienes expusieron precursores de células mieloides y eritroides al sistema hemolítico con sacarosa (CFU-E, BFU y CFUGM) demostraron un decaimiento en el número de colonias de eritrocitos y células mieloides en presencia de complemento pero no en su ausencia.

Estos resultados sugieren que la Hemoglobinuria Paroxística Nocturna (CFU-E, BFU-E y CFUGM) expresa una anomalía en la membrana de los eritrocitos y que la enfermedad es el resultado de un cambio que ocurre a nivel de célula madre hematopoyética plu-

ripotencial.

Nicholson y colaboradores (14) estudiaron HPN-E (eritrocitos-HPN) mediante la sensibilización por isoaglutininas para medir la susceptibilidad a la lisis mediada por el complemento, observaron que dichos eritrocitos, pueden ser agrupados en base a esta susceptibilidad como: Tipo I aquellos que se comportan como eritrocitos normales y que son originados de células madre hematopoyética normal; Tipo II los cuales son 3 a 5 veces más sensibles que los eritrocitos normales y Tipo III a los que son 15 a 25 veces más sensibles al complemento.

La activación del complemento que permite la lisis de HPN-E-- "in vitro" puede provenir por la vía clásica, por la vía alterna o por el tratamiento ácido de C_5 que resulta en formación subsecuente del complejo lítico de las proteínas del complemento C_{5-9} . Al mismo tiempo mediante las técnicas de inmunoprecipitación se aislaron del estroma del eritrocito normal 2 proteínas que disminuyen la estabilidad de la vía clásica y alterna C_3 convertasa, denominadas: Factor de Aceleración Decayente (DAF) y C_{3bR} . Al aplicar la misma técnica pero ahora con HPN-E observaron que los tipo I presentan C_{3bR} pero son deficientes en DAF, los tipo II--son relativamente deficientes en DAF y el tipo III muestran una ausencia total de DAF lo que sugiere que el DAF puede proteger las membranas de los eritrocitos normales de la enfermedad resultante de la activación del complemento autólogo. La base para el diagnóstico de esta enfermedad es la susceptibilidad de los HPN-E a la acción lítica del complemento.

C A P I T U L O I I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la anemia aplástica se presentan características clínicas-tales como: pancitopenia en sangre periférica e hipocelularidad variable en médula ósea o bien ausencia de células, sin embargo, uno de los problemas que presenta su diagnóstico es la asociación clínica de este padecimiento con la hemoglobinuria paroxística nocturna; por lo que motivo a hacer el planteamiento del estudio de niños captados en el Hospital General del Centro Médico " La Raza " con diagnóstico compatible con Anemia Aplástica, para observar si dentro de esta población de niños podría encontrarse una Hemoglobinuria Paroxística Nocturna, y al mismo tiempo establecer un diagnóstico diferencial.

Objetivo General:

Proporcionar alternativas a nivel laboratorio que lleven a esclarecer y coadyuvar al diagnóstico diferencial de la Anemia Aplástica, así como su valor pronóstico.

H I P O T E S I S

La hipoplasia celular que se presenta tanto en la Anemia --- Aplástica como en la Hemoglobinuria Paroxística Nocturna permiten establecer una asociación clínica entre ambas; pruebas de laboratorio como: " La prueba de hemólisis de inulina ", " Prueba de hemólisis ácida " y " Prueba de la hemólisis de sacarosa " proporcionan un diagnóstico diferencial entre ambas.

Las pruebas de laboratorio tales como; " Determinación de hemoglobina fetal " y la cuenta de reticulocitos, pueden ser consideradas como valores pronóstico en la Anemia Aplástica.

CAPITULO III

MATERIAL

- Algodón
- Bulbos para pipeta Pasteur
- Cámaras de Neubauer
- Capilares
- Cubrehematímetro
- Cubreobjetos
- Cronómetro
- Embudos de vidrio, talle largo y corto
- Espátula
- Gradillas metálicas para 20 tubos
- Jeringas de 5 y 20 ml
- Matraces aforados de 25 y 100 ml
- Matraces erlenmeyer de 25, 50, 250, y 500 ml
- Papel filtro
- Papel pH
- Papel parafilm
- Pipetas graduadas de 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, y 10 ml
- Pipetas para glóbulos blancos
- Pipetas para hemoglobina
- Pipetas Pasteur
- Portaobjetos
- Probetas graduadas de 50 y 100 ml
- Tubos de ensaye de 13 x 100, 12 x 75 y 15 x 160
- Tubos cónicos graduados
- Vasos de coplin
- Vasos de precipitado de 10, 50, 100 y 250 ml

E Q U I P O

- Agitador mecánico; Vortex
- Balanza analítica; Mettler
- Balanza granataria; Mettler
- Baño María; J. M. Ortiz
- Centrífuga; Sol-Bat
- l.Espectrofotómetro; E. Leitz
- Microscopio de luz visible; Carl Zeiss
- Refrigerador a 4°C; General Electric

MATERIAL BIOLÓGICO

- Sangre periférica (Paciente)
- Sangre Total (Donador)
- Suero fresco (con complemento)
- Suero descomplementado
- Orina

REACTIVOS

- Acido clorhídrico 10 N y 0.2 N
- Cloruro de sodio
- Cloruro de potasio
- Clorhidrato de L-cisteina al 10%
- Eter etílico
- Ferricianuro de potasio
- Fosfato de potasio monobásico
- Fosfato de potasio dibásico
- Heparina
- Hidróxido de sodio 0.1 N
- Inulina al 0.1%
- Sacarosa al 9.2%
- Safranina al 0.1%
- Solución salina al 0.85%
- Sulfato de amonio al 50% de saturación
- Tolueno

La preparación de los reactivos se describe en el
apéndice " A "

Se captaron y analizaron a los pacientes que acudieron al servicio de hematopediatria del Hospital General Centro Médico " La Raza " con diagnóstico de Anemia Aplástica.

PRUEBA DE HEMOLISIS DE INULINA

FUNDAMENTO:

Muller Eberhard observó que un complejo enzimático formado por las proteínas del veneno de la cobra y una proteína sérica humana era capaz de activar el complemento con un consumo de los últimos componentes ($C_3 - C_9$) sin afectar los primeros ($C_1C_2C_4$), deduciendo entonces que debía existir una " vía alterna " de activación del complemento. Tanto los polisacáridos como la inulina son capaces de activar el proceso alternativo de la secuencia del complemento.

METODO:

1. Depositar 2 ml de sangre en un tubo de ensayo de 12 x 75 que contenga 1 gota de Inulina (0.05 ml)
2. Dejar reposar 30 minutos a temperatura ambiente.
3. Centrifugar el tubo durante 5 minutos a 2,500 rpm.

INTERPRETACION:

La presencia de hemólisis en el plasma nos indicará una prueba positiva (+); mientras que la ausencia de hemólisis denotará la prueba como negativa (-).

PRUEBA DE LA HEMOLISIS ACIDA (HAM)

FUNDAMENTO:

Los glóbulos rojos de pacientes con hemoglobinuria paroxística nocturna sufren lisis al incubarlos a 37°C en suero normal compatible fresco acidificado a pH 6.5. Esta prueba es la más específica y debe dar negativa cuando los glóbulos rojos del paciente se incuban con suero acidificado normal (inactivado) y positiva cuando los glóbulos rojos se incuban con su propio suero acidificado.

METODO:

Preparación del Testigo positivo:

- a) Tomar 4.0 ml de sangre del donador en un tubo de 13 x 100 que contenga una gota de heparina.
- b) Centrifugar el tubo a 2, 500 rpm, eliminar el plasma.
- c) Lavar con solución salina al 0.85% 3 veces.
- d) Obtener paquete de glóbulos rojos.
- e) Preparar solución de L-cisteína al 10% y agregar 1 ml de glóbulos rojos obtenidos en el paso anterior, resbalando lentamente por las paredes del vaso y agitando lentamente.
- f) Incubar a 37°C durante 15 minutos (en el vaso)
- g) Pasar a un tubo y centrifugar a baja velocidad (1, 500 rpm) durante 2 minutos, con el objeto de producir un aglomerado flojo de eritrocitos.

NOTA: Manejar la muestra con mucho cuidado, para evitar hemólisis mecánica.

h) Lavar los eritrocitos con solución salina al 0.85% hasta que el sobrenadante aparezca sin huellas de hemólisis. (se aumentan las rpm a 2, 500 durante 4 minutos).

i) Resuspender los eritrocitos al 50% (vol-vol) con solución salina al 0.85% en el último lavado.

Preparación del testigo Normal:

a) Tomar 4 ml de sangre del donador en un tubo de 13 x 100 que contenga 1 gota de heparina.

b) Centrifugar el tubo a 2, 500 rpm, eliminar el plasma.

c) Lavar con solución salina al 0.85% 3 veces.

d) Obtener paquete de glóbulos rojos.

e) Diluir al 50% con solución salina al 0.85% hasta el momento de utilizarlos

Preparación de eritrocitos del paciente al 50%:

a) Tomar 4.5 ml de sangre del paciente y colocarlos en un tubo de 13 x 100 que contenga 1 gota de heparina.

b) Centrifugar a 2, 500 rpm durante 5 minutos.

c) Eliminar el plasma.

d) Lavar con solución salina al 0.85% 3 veces.

e) Obtener paquete de glóbulos rojos

f) Diluir al 50% con solución salina al 0.85%, hasta el momento de utilizarlos.

Obtención de suero fresco (con complemento) y suero sin complemento;

a) Tomar 3 tubos de 13 x 100 con 4.0 ml. de sangre -- del donador.

b) centrifugar los tubos para obtener todo el suero - posible.

c) Se separan 4 ml. de suero fresco y se refrigeran - hasta el momento de utilizarlos. (suero con complemento).

d) En otro tubo se toman 2 ml. de suero.

e) El tubo se pone a baño maría a 62°C durante 3 minutos. (suero descomplementado).

Montar una serie de tubos de 12 x 75 en una gradilla bajo el siguiente esquema:

SOLUCIONES	TUBOS		
	I (ml)	II (ml)	III (ml)
HCl 0.2 N		0.05	0.05
Suero Fresco (con complemento)	0.5	0.5	
Eritrocitos del paciente al 50%	0.05	0.05	0.05
Suero descomplementado.			0.5
Eritrocitos "N" (normal) al 50%	0.05	0.05	0.05
Eritrocitos Testigo al 50%	0.05	0.05	0.05

- Tapar los tubos con papel parafilm.
- Mezclar suavemente e incubar a 37°C en baño maría durante 1 hora.
- Sacar los tubos del baño y mezclar suavemente.
- Centrifugar a 3, 400 rpm durante 5 minutos.

INTERPRETACION:

Comparar la hemólisis obtenida en los tubos de la columna II con respecto de la serie I y II que no deben de mostrar--- hemólisis.

PRUEBA DE LA HEMOLISIS CON SACAROSA

FUNDAMENTO:

Cuando se suspenden eritrocitos normales en una solución de sacarosa y suero fresco no se presenta lisis osmótica debido a que su membrana resiste este tratamiento. Los eritrocitos de hemoglobinuria paroxística nocturna en cambio sufren lisis por este tratamiento. Es posible que la baja fuerza iónica de la solución de sacarosa que se emplea, aumenta la unión de componentes del complemento a la membrana del eritrocito produciendo lesiones en la membrana que lleven a la pérdida del contenido celular y finalmente a la lisis.

METODO:

a) Se emplean las mismas muestras y diluciones que se utilizaron para la prueba de la hemólisis ácida (HAM).

b) Preparar al momento de iniciar la prueba una solución de sacarosa al 9.2% en solución reguladora de fosfatos.

Montar una serie de tubos de 12 x 75 bajo el siguiente esquema:

SOLUCIONES	T U B O S		
	I (ml)	II (ml)	III(ml)
Solución de sa- carosa al 9.2%	0.85	0.85	0.85
Suero Fresco (con complemento)		0.05	
Suero descomple- mentado.	0.05		0.05
Eritrocitos del paciente al 50%	0.1	0.1	0.1
Eritrocitos "N" (normal)al 50%	0.1	0.1	0.1
Eritrocitos del Testigo(+)al 50%	0.1	0.1	0.1

- Tapar los tubos con papel parafilm.
- Mezclar suavemente e incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- Mezclar suavemente al termino de la incubación.
- Centrifugar a 3, 400 rpm durante 5 minutos.

INTERPRETACION:

Comparar la hemólisis obtenida en los tubos de la columna II con respecto de las series I y III, que no deben de -- mostrar hemólisis.

PRUEBA DE LA HEMOGLOBINA FETAL

FUNDAMENTO:

Se sabe que la hemoglobina fetal a pesar de ser el tipo de hemoglobina principal en los períodos pre y post-natales se produce en cantidades crecientes en algunas anomalías de terminadas genéticamente y en algunos desordenes hematológicos-adquiridos como son: Talasemia, Anemia Aplástica, anemia de células falciformes, ciertas formas de leucemia y muchas otras. La hemoglobina fetal y la hemoglobina de Bart, relativamente son mucho mas resistentes a la desnaturalización por los álcalis que otro tipo de hemoglobinas. Esta propiedad se ha empleado extensamente para cuantificar la hemoglobina por probar y exactamente después de transcurrir un minuto se detiene la reacción adicionando sulfato de amonio a media saturación determinando así la cantidad de hemoglobina no desnaturalizada fotocolorímetricamente a 550 nm de longitud de onda.

METODO:

Preparación del hemolizado normal:

- a) Obtener sangre total del paciente.
- b) Separar el plasma.
- c) Lavar de 3 a 4 veces con solución salina al 0.85% (para eliminar proteínas del plasma).
- d) Agregar agua desmineralizada (vol-vol) según la cantidad de paquete que se obtenga (para lisar la membrana de los eritrocitos).

e) Añadir gotas de tolueno (para eliminar proteínas de la membrana) que sean proporcionales a los ml de agua desmineralizada añadida en el paso d (ejemplo: 2 ml entonces 2 gotas de tolueno). Agitar durante 3 minutos.

f) Centrifugar 20 minutos a 2, 000 rpm.

g) Separar con cuidado el estroma que se forma en el sobrenadante y filtrar.

h) Diluir o concentrar el hemolizado a 10 gramos.

Cálculos para determinar los 10 gramos de hemoglobina:

Esto se efectúa mediante la fórmula:

$$V_1 C_1 = V_2 C_2$$

V_1 = volumen total del hemolizado (tubo cónico -- graduado).

V_2 = volumen a determinar

C_1 = concentración total del volumen (V_1)

C_2 = concentración de 10 g. de hemoglobina

NOTA: Para esta prueba se utiliza como control --- sangre de cordón umbilical. Así tanto la --- muestra como el control se ajustan a 10g.

Preparación de Mezcla de reacción:

- Filtrar de 30 a 35 ml de una solución de $(SO_4)_2-$ NH_4 al 50% de saturación.

- De esta mezcla tomar 20.4 ml, colocarlos en un - matraz y agregar 9.6 ml de NaOH 0.1 N a esta mezcla se rotu

la como " Mezcla de reacción ".

- Colocar en un matraz 1.6 ml de NaOH 0.1 N y agregar 0.1 ml del hemolizado a 10 g.

NOTA: Al momento de poner 0.1 del hemolizado se crónometra 1 minuto soplando hasta hacer espuma, después del minuto adicionar inmediatamente 3.4 ml de la solución $(SO_4)_2NH_4$ al 50% de saturación-- filtrada al inicio.

- Filtrar. El filtrado se recibe en un tubo que se rotula como 100%.

- Colocar en otro matraz 5.0 ml de la mezcla de reacción y 0.1 del hemolizado ajustado a 10 gramos.

- Filtrar en un tubo que se rotula como tubo II.

- Agregar en otro tubo 2.0 ml de la mezcla de reacción y 2.0 ml del filtrado del tubo II.

- Rotular como 50%.

- Leer la absorbancia de los tubos "100%" y "50%" a 550 nm.

NOTA: Utilizar como blanco la "mezcla de reacción"

CALCULOS:

$$Hb_{fetal} = \frac{\text{Absorción del tubo al 100\%}}{\text{Absorción del tubo al 50\%(2)}} \times 100$$

VALORES DE REFERENCIA:

0.3 - 1.6 mg/ % .

PRUEBA DE LA HEMOSIDERINA

FUNDAMENTO:

La hemosiderina se origina de la digestión de eritrocitos envejecidos por el retículo celular, y representa en el hombre la forma principal de depósito de hierro, y aunque inicialmente se compone de ferritina, parece existir en una variedad de formas químicas como los complejos proteína-hierro mezclados con lípidos, sacaridos cobre y calcio. La hemosiderina generalmente esta presente en el sedimento urinario de pacientes con hemólisis intravascular, hemoglobinemia y hemoglobinuria, y en pacientes con hemocromatosis; y puede ser demostrada en forma de gránulos libres, o gránulos en el interior de las células epiteliales. La tinción se basa en la reacción bien conocida del azul de prusia. El hierro iónico reacciona con una solución de ferrocianuro ácido para dar un color azul.

METODO:

1. Obtener muestra de orina del paciente

NOTA: Esta debe ser obtenida en un recipiente "libre de hierro"

2. Centrifugar.
3. Hacer frotis con el sedimento de la orina.
4. Fijar el frotis con éter durante 10 segundos.
5. Sumergir el frotis en azul de prusia durante 1h.

NOTA: El azul de prusia debe ser filtrado antes de utilizarse.

6. Teñir con safranina para contraste durante 5 seg.

NOTA: La safranina se prepara al 0.1%

7. Lavar y dejar secar.

8. Examinar al microscopio.

INTERPRETACION:

Buscar depósitos de hierro en células epiteliales, si se encuentra una coloración azul en forma de pequeños gránulos en la región periférica de la célula; se denotará como: Hemosiderina (+) positiva. Si no se encuentran dichos gránulos en las células epiteliales indicara hemosiderina (-) negativa.

* Preparación del material "libre de hierro" ver inciso f del -
ápndice " A " .

CAPITULO IV

R E S U L T A D O S

En el presente trabajo realizado en el Hospital General Centro Médico " La Raza " se estudiaron 30 pacientes de edad entre 0-19 años con diagnóstico compatible con Anemia Aplástica. A éstos se les determinó en primer lugar la biometría hemática. (ver tabla 5).

Posteriormente para llevar a cabo las pruebas de diagnóstico diferencial se tomaron muestras de sangre periférica del paciente; así como sangre venosa de un donador con el mismo grupo sanguíneo del paciente; los resultados obtenidos de estos análisis especiales se resumen en la tabla 4.

La tabla 1 y gráfica 1 nos muestran la frecuencia de edades de los pacientes estudiados; asimismo en la tabla 2 y gráfica 2 se observa la distribución por sexos que se presentó en el padecimiento.

En la tabla 3 se exponen los factores predisponentes así como la frecuencia de los mismos en el grupo de niños estudiados.

En la tabla 5 se resumen los resultados de edad, sexo, biometría hemática; así como aspecto de la médula ósea para cada uno de los pacientes en estudio.

En las gráficas 3, 4 y 5 se exhibe el grado de pancitopenia que

presentaron los pacientes en el momento de la determinación de las pruebas. Leucocitos mayores de 4,000 (47%), menores de --- 4,000 (53%); plaquetas mayores de 20,000 (70%), menores de --- 20,000 (30%); reticulocitos mayores de 1% (57%) y menores de 1% (30%).

En la gráfica 6, se manifiesta el porcentaje de pacientes con una emoglobina fetal mayor de 400 mg/100ml (60%), así como los - que estan por debajo de este valor (40%).

Las gráficas 7, 8 y 9, nos exponen la relación que existe entre la hemoglobina fetal total, el porciento de reticulocitos y la supervivencia.

T A B L A 1
FRECUENCIA DE ANEMIA APLASTICA POR EDADES (AÑOS)

EDAD	No. DE PACIENTES	%
0	0	0
1	0	0
2	1	3
3	1	3
4	1	3
5	0	0
6	0	0
7	3	10
8	4	13
9	1	3
10	2	7
11	4	13
12	4	13
13	1	3
14	3	10
15	1	3
16	3	10
17	0	0
18	1	3
19	1	3

T A B L A 2

FRECUENCIA DE ANEMIA APLASTICA POR SEXO

SEXO	No. DE PACIENTES	%
FEMENINO	16	53
MASCULINO	14	47

T A B L A 3

FRECUENCIA DE FACTORES PREDISPONENTES EN LA ANEMIA
APLASTICA EN EL GRUPO DE NIÑOS ESTUDIADOS

AGENTE	No. DE PACIENTES	%
INSECTICIDAS	12	40
IDIOPATICOS	9	30
PESTICIDAS Y DESINFEC- TANTES.	4	13
PINTURAS Y SOLVENTES	3	10
MIELODEPRESORES	1	3
CLORAFENICOL	1	3

T A B L A 4

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS A LAS QUE FUERON SOMETIDOS LOS
PACIENTES ESTUDIADOS CON DIAGNOSTICO DE ANEMIA APLASTICA

PACIENTE	PRUEBAS DE			
	HEMOSIDERINA SACAROSA	HAM (ACIDA)	INULINA	
1	negativo	negativo	negativo	negativo
2	negativo	negativo	negativo	negativo
3	negativo	negativo	negativo	negativo
4	negativo	negativo	negativo	negativo
5	negativo	negativo	negativo	negativo
6	negativo	negativo	negativo	negativo
7	negativo	negativo	negativo	negativo
8	negativo	negativo	negativo	negativo
9	negativo	negativo	negativo	negativo
10	negativo	negativo	negativo	negativo
11	negativo	negativo	negativo	negativo
12	negativo	negativo	negativo	negativo
13	negativo	negativo	negativo	negativo
14	negativo	negativo	negativo	negativo
15	negativo	negativo	negativo	negativo
16	negativo	negativo	negativo	negativo
17	negativo	negativo	negativo	negativo
18	negativo	negativo	negativo	negativo
19	negativo	negativo	negativo	negativo
20	negativo	negativo	negativo	negativo
21	negativo	negativo	negativo	negativo
22	negativo	negativo	negativo	negativo
23	negativo	negativo	negativo	negativo
24	negativo	negativo	negativo	negativo
25	negativo	negativo	negativo	negativo
26	negativo	negativo	negativo	negativo

T A B L A 4 (continuación)

PACIENTE	PRUEBAS DE			
	HEMOSIDERINA	SACAROSA	HAM (ACIDA)	INULINA
27	negativo	negativo	negativo	negativo
28	negativo	negativo	negativo	negativo
29	negativo	negativo	negativo	negativo
30	negativo	negativo	negativo	negativo

TABLA 5

TABLA GENERAL DE RESULTADOS

PACIENTE	EDAD AÑOS	SEXO	FACTOR PREDISPONENTE	SUPERVIVENCIA AÑOS	Hb.FETAL TOTAL Mg/100Ml.	RETIS %	LEUCOCITOS (mm ³)	PLAQUETAS (mm ³)	MEDULA OSEA
1	2	M	CLORANFENICOL	1-4 MESES	48.4	0.5	9,100	354,000	NORMOCELULAR CELULAS PLASMATICAS 2 CELULAS RETICULARES 1
2	4	M	INSECTICIDAS	3-4 MESES	324	0.4	2,650	11,000	CELULARIDAD 20% SERIE ERITROIDE Y MIE LOIDE. MEGACARIOS AUSENTES
3	7	M	INSECTICIDAS	5-7 MESES	1648	1.7	4,100	20,000	HIPOCELULAR, ESCASOS MEGACARIOS SERIE ERITROIDE Y MIE LOIDE.
4	7	F	INSECTICIDAS	1-6 MESES	1112.4	1.3	3,700	14,000	HIPOCELULAR +++ MEGACARIOS AUSENTES
5	7	M	IDIOPATICO	2 AÑOS	17.0	0.11	1,950	14,000	HIPOCELULAR ++ AUSENCIA DE MEGACARIOS
6	8	F	INSECTICIDAS Y TOXICOS	3 AÑOS	1,245	0.4	4,200	18,000	HIPOCELULAR ++ AUSENCIA DE MEGACARIOS
7	8	F	SOLUCIONES Y PINTURAS	3-4 MESES	631.8	1.4	4,550	152,000	HIPOCELULAR MEGAS AUSENTES
8	8	M	IDIOPATICO	2-3 MESES	208	0.63	4,850	135,000	HIPOCELULAR ++ AUSENCIA DE MEGACARIOS
9	8	F	INSECTICIDAS	8 MESES	187	0.16	3,350	20,000	HIPOCELULAR +++; ME- GAS AUSENTES, CELS. RETICU- LARES: 2 CELS. PLASMATI- CAS 7

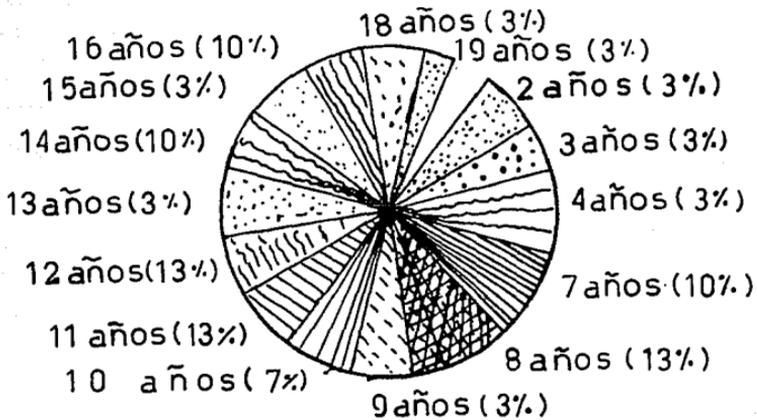
T A B L A 5 (CONTINUACION)

PACIENTE	EDAD AÑOS	SEXO	FACTOR PREDISPOHENTE	SUPERVIVENCIA AÑOS	Hb. FETAL TOTAL Mg/100Ml.	RETIS %	LEUCOCITOS (mm ³)	PLAQUETAS (mm ³)	MEDULA OSEA
10	9	M	IDIOPATICO	4 AÑOS	1371.6	1.2	4,600	40,000	HIPOCELULAR DE PRECURSORES ERI- TROIDES.
11	10	M	PINTURAS Y SOLVENTES	5 AÑOS	280.8	1.60	2,450	12,000	HIPOCELULAR +++ SERIE ROJA, MEGACA- RIOS AUSENTES CELULAS PLASMATICAS +
12	10	F	PESTICIDAS Y DESINFEC- TANTES CASEROS.	2 AÑOS 4 MESES	350	4.0	1,350	18,000	HIPOCELULAR++ MEGAS +++ CELULAS PLASMATICAS.
13	11	M	TOXICOS	2 AÑOS	360.75	4.0	1,900	11,000	CELULARIDAD +++ MEGAS AUSENTES CELULAS PLASMATICAS 9 CELULAS RETICULARES 2
14	11	F	IDIOPATICO	8 AÑOS	1,062	3.2	3,100	29,000	HIPOCELULAR +++ MEGACARIOS 6% ERITROBLASTOS
15	11	M	IDIOPATICO	4 AÑOS	624	0.6	2,450	110,000	HIPOCELULAR ++ AUSENCIA DE MEGACARIOS
16	11	M	INSECTICIDAS	3 MESES	130.5	0.2	1,400	24,000	HIPOCELULAR CELULAS PLASMATICAS AUSENCIA DE MEGACARIOCITOS
17	12	F	TOXICOS	10 MESES	1,057.5	0.37	1,750	13,000	HIPOCELULAR +++ CELU- PLASMATICAS AUSENCIA DE PRECURSORES DE LAS 3 SERIES.
18	12	F	INSECTICIDAS	8-5 MESES	1,014	1.80	2,700	63,000	HIPOCELULAR ++ AUSENCIA DE MEGACARIOCITOS SERIE ERITROIDE.
19	12	M	IDIOPATICO	4 AÑOS	216	1.2	4,050	39,000	HIPOCELULAR + MEGACARIOS AUSENTES.

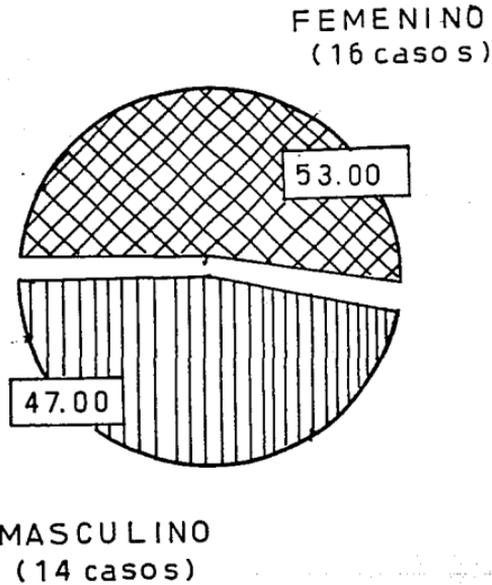
T A B L A 5 (CONTINUACION)

PACIENTE	EDAD AÑOS	SEXO	FACTOR PREDISPONENTE	SUPERVIVENCIA AÑOS	Hb. FETAL TOTAL Mg/100ML.	RETIS %	LEUCOCITOS (mm ³)	PLAQUETAS (mm ³)	MEDULA OSEA	
20	12	M	INSECTICIDAS	1 MES	609.6	1.1	3,000	8,000	HIPOCELULAR + CELULAS PLASMATICAS Y RETICULARES	
21	13	F	INSECTICIDAS	10 AÑOS	500	2.48	4,600	83000	HIPOCELULAR, AUSEN- CIA DE MEGACARIOS, SERIE ERITROIDE Y - MIELOIDE.	
22	14	F	IDIOPATICO	11MESES	41.4	0.28	2,350	95000	HIPOCELULAR ++ MEGACARIOS AUSENTES.	
23	14	F	INSECTICIDAS	3-9 MESES	1176	0.7	3,300	36000	NORMOCELULAR, MEGAS CELULAS PLASMATICAS	
24	15	F	PINTURAS	7 AÑOS	493.5	1.3	5,500	104,000	HIPOCELULAR + MEGACARIOS AUSENTES	
25	16	F	INSECTICIDAS	4 AÑOS	1567.8	2.3	4,600	22,000	HIPOCELULAR +++ MEGAS AUSENTES	
26	16	F	IDIOPATICO	12 AÑOS	358.4	2.5	6,350	179,000	NORMOCELULAR MEGACARIOS	
27	16	F	INSECTICIDAS	2 AÑOS	627.2	1.4	6.600	53,000	HIPOCELULAR +++ MEGAS AUSENTES PRESENCIA DE CELULAS PLASMATICAS.	
28	18	F	AGENTES MIELODEPRESORES	8-4 MESES	478.8	1.9	3,850	93,000	HIPOCELULAR +++ ABSOLUTA DE LAS 3 SE- RIES	
29	19	M	IDIOPATICO	6 AÑOS	275.4	0.9	4,100	23,000	HIPOCELULAR +++ MEGAS AUSENTES CELULAS PLASMATICAS 7 CELULAS RETICULARES 2	
30	14	M	IDIOPATICO	1-5 MESES	1161.6	0.8	4,600	90,000	HIPOCELULAR + MEGAS AUSENTES.	

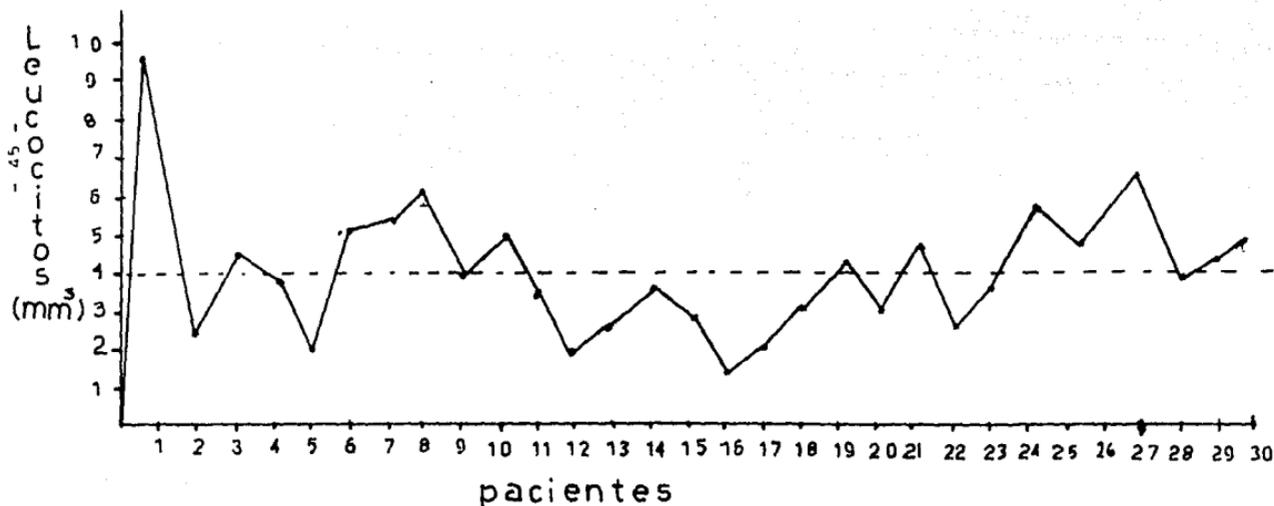
Grafica No 1
Edad vs % del número de
pacientes estudiados.



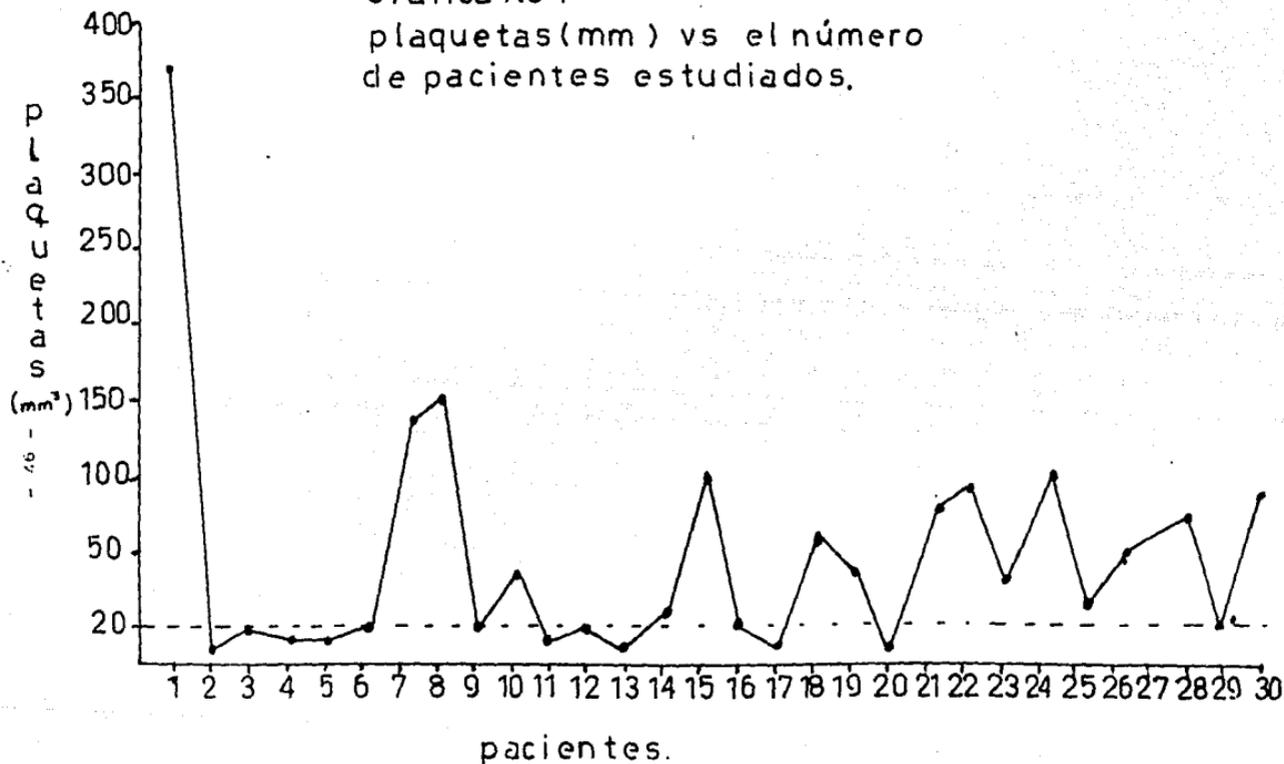
Grafica No 2
Sexo vs porciento de
pacientes estudiados.



Grafica No 3
Valores de leucóцитos (mm^3)
numero de ^{vs} pacientes estudiados.

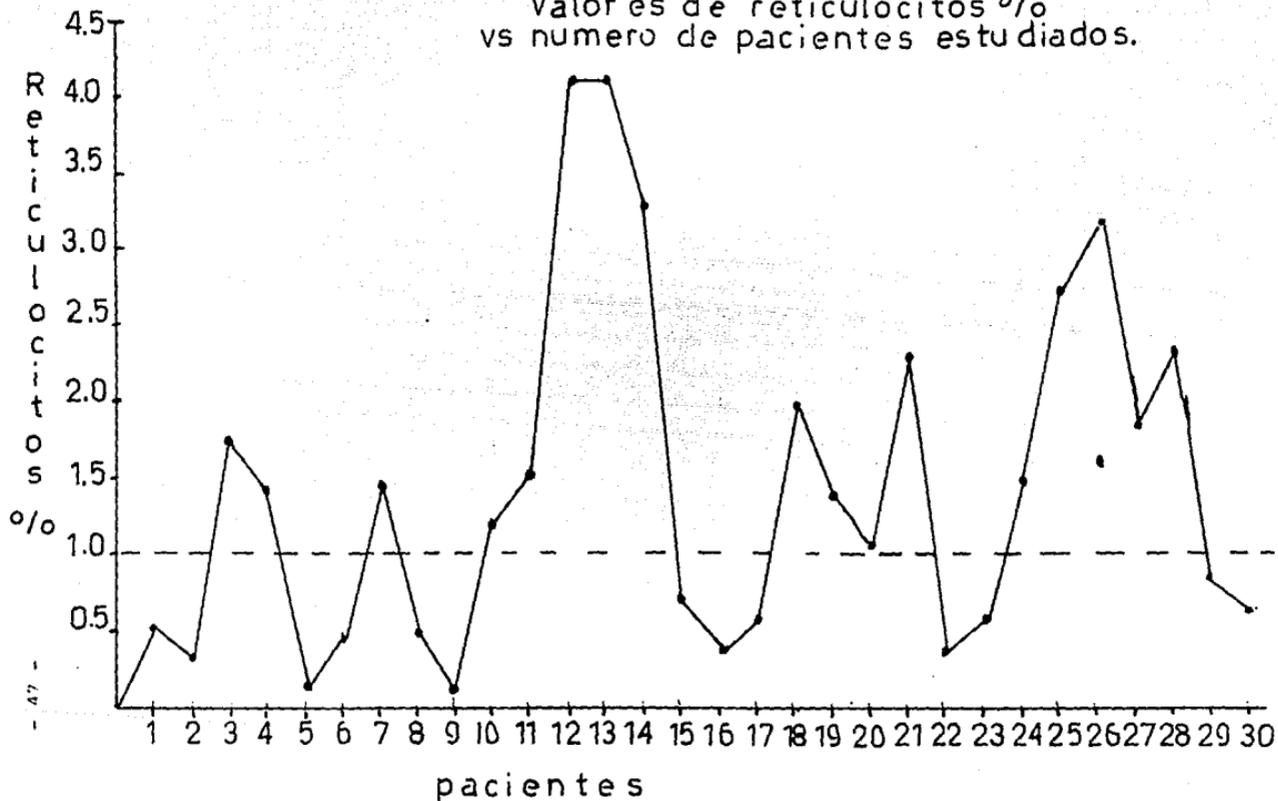


Grafica No 4
plaquetas(mm) vs el número
de pacientes estudiados.



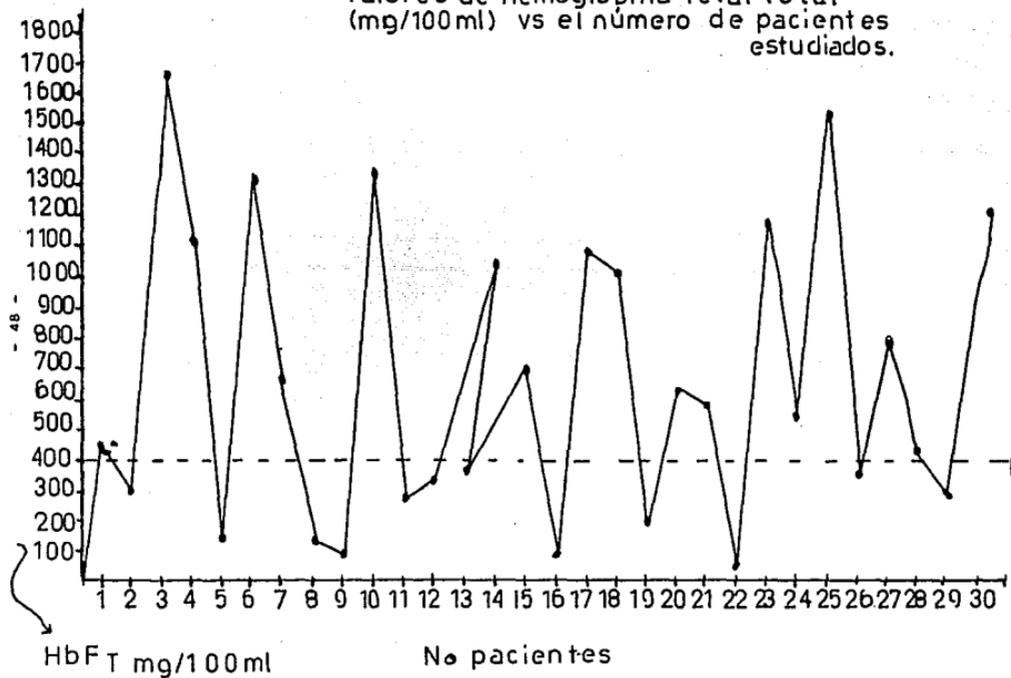
Grafica No 5

Valores de reticulocitos %
vs numero de pacientes estudiados.

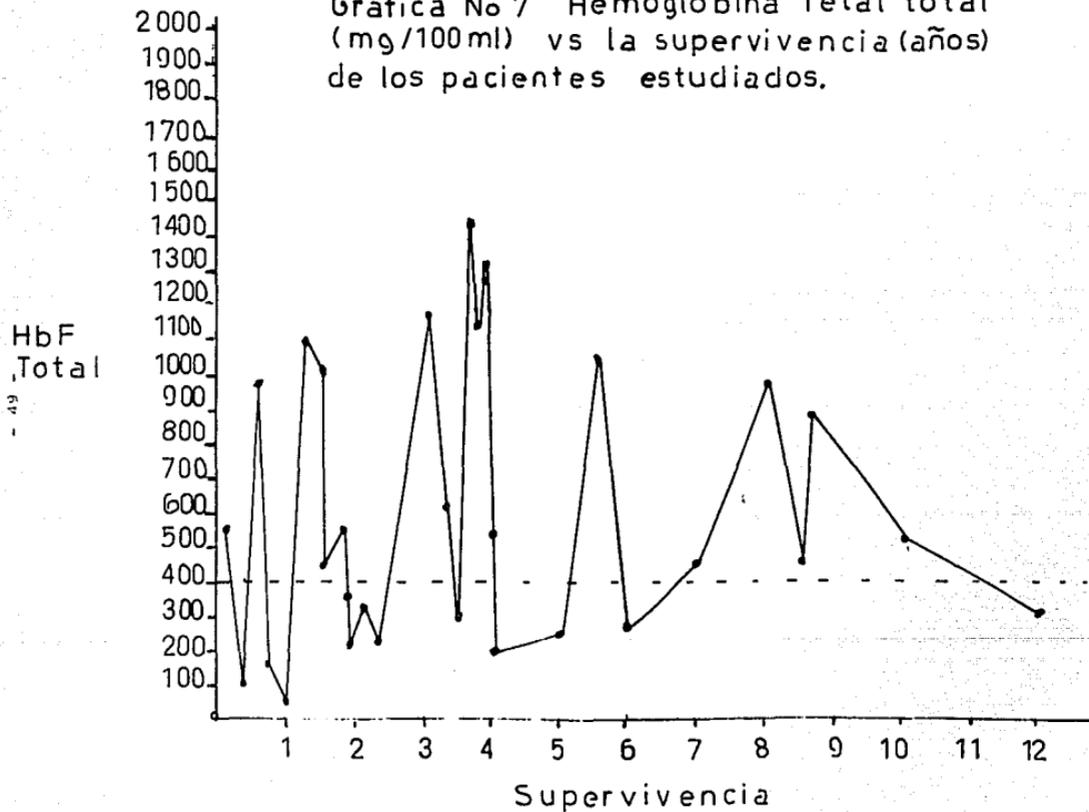


Grafica No 6

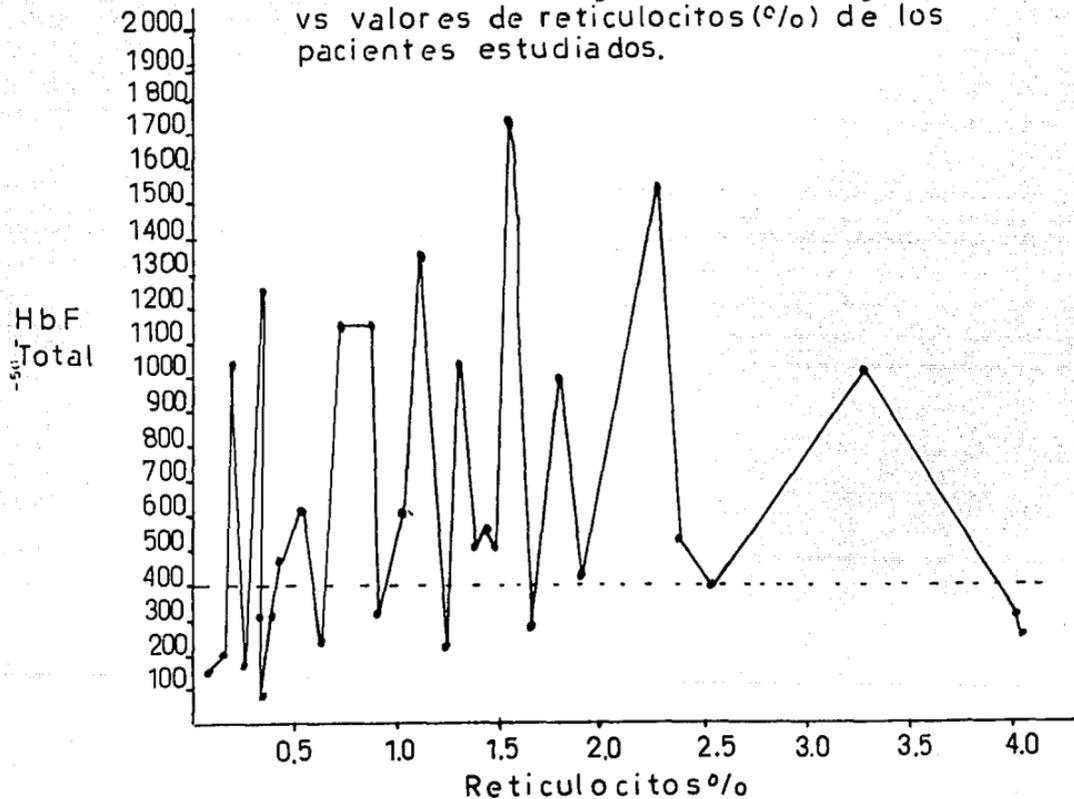
Valores de hemoglobina fetal total
(mg/100ml) vs el número de pacientes
estudiados.



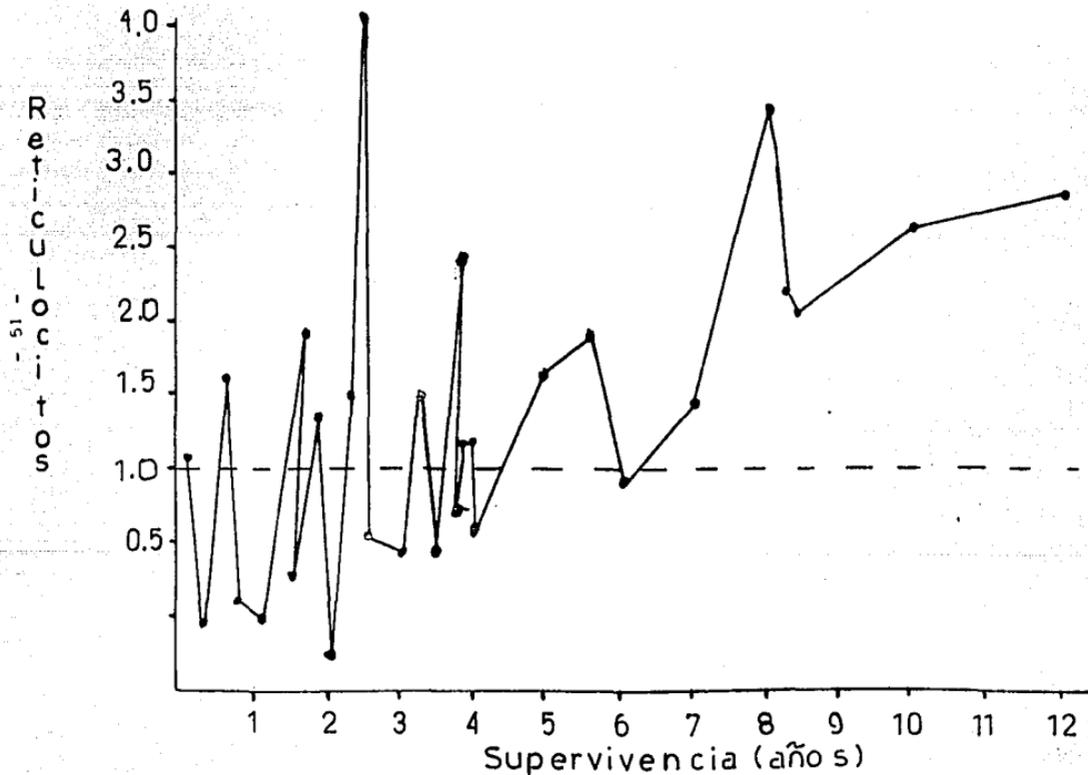
Grafica No 7 Hemoglobina fetal total
(mg/100ml) vs la supervivencia (años)
de los pacientes estudiados.



Grafica No 8 Hemoglobina fetal (mg/100ml)
vs valores de reticulocitos (‰) de los
pacientes estudiados.



Grafica No 9. Valores de reticulocitos(%) vs la supervivencia(años) de los pacientes estudiados.



ANÁLISIS DE RESULTADOS

De acuerdo al escrutinio realizado se describen y analizan a continuación los resultados obtenidos:

En la tabla 4 se resumen los valores de las pruebas de diagnóstico diferencial realizadas para cada paciente. Estas pruebas son las utilizadas para el diagnóstico de la hemoglobinuria paroxística nocturna; encontrándose que todas ellas resultaron negativas. Estas pruebas especiales se realizaron en cada uno de los pacientes; debido a la inquietud que surgió en el servicio por saber si dentro de este grupo de niños pudiese existir la posibilidad de un caso de hemoglobinuria paroxística nocturna; y que no se estuviese tratando como tal. No obstante como se ha visto los resultados obtenidos en las pruebas son negativos; de esta manera se descarto entonces dicha posibilidad.

Posteriormente se procedió a obtener los datos de pronóstico en la anemia aplástica del grupo de pacientes en estudio.

En la tabla 1 se describe el número de pacientes y sus edades; observándose una mayor incidencia entre los 8, 11 y 12 años (gráfica 1) con una predominancia en el sexo femenino (tabla 2, 5, gráfica 2). Estos resultados son similares a estudios hechos en países de latinoamerica, donde al igual que en este caso no se tiene una explicación para el escaso número de enfermos correspondientes al período de 9-10 años, a pesar de que nuestra población infantil es en este caso pequeña; con respecto al sexo no puede mencionarse una división concreta pues para el sexo femeni

no la diferencia es sólo ligeramente mayor.

En la tabla 3 se da la frecuencia de los factores predisponentes en la anemia aplástica del grupo, mostrándose un porcentaje mas alto (40%) para los insecticidas, seguido de la forma idiopática (30%), siendo el porcentaje mas bajo para agente mielodepresor y cloranfenicol (3%) respectivamente. Tales hallazgos coinciden con los estudios hechos en cuanto a los factores predisponentes en la anemia aplástica aquí en México; donde se consideran a los insecticidas (D.D.T.) como los principales factores -- predisponentes y no lo es el cloranfenicol a pesar de su uso --- irrestringido en nuestro país.

El grado de pancitopenia que se manifiesta en los pacientes - en el momento de determinadas las pruebas fue evaluado con base en los criterios dados por la agrupación para el estudio de la anemia aplástica así tenemos que: para los leucocitos el valor de referencia tomado en cuenta fue de 4,000 presentándose 14 casos arriba de este valor y 16 casos por debajo del mismo; en el caso de las plaquetas fue de 20,000 mostrando 21 casos mayores a este valor y únicamente 9 casos para valores menores, para los reticulocitos el criterio tomado en cuenta fue el valor de 1% -- donde se advierten 17 casos por arriba del valor mencionado y 13 casos para valores menores. Así se advierte que con base en los criterios tomados en cuenta, las plaquetas y los reticulocitos; muestran que la mayoría de los pacientes en estudio reflejan un grado de pancitopenia favorable en el momento de la determina--- de las pruebas.

Para la hemoglobina fetal total se tomo como valor de referencia: 400 mg/100 ml como base en los estudios hechos por Bloom -- et al., quienes observaron que los pacientes con altos niveles -- de hemoglobina fetal total son los mas cercanos a presentar una remisión y a tener un diagnóstico favorable, mientras que los -- que tenian valores por abajo de 400 mg/ 100 ml no.

En nuestro caso particular el número de pacientes que tuvieron una hemoglobina fetal total mayor de 400 mg/100 ml fue de 16 casos (80%) y menores de éste valor 12 casos (40%). (gráfica 6,- tabla 5).

En la gráfica 7 se observa como a un valor mayor de hemoglobina fetal total (arriba de 400 mg/100 ml) aumenta la sobrevivencia de los pacientes, ésto se presenta en mas del 50% de los casos, así mismo el mayor número de pacientes (76%) está en el período de -- sobrevivencia de 5 años y unicamente 8 pacientes (20%) presentan una evolución mayor de 5 años. Los mismos estudios hechos por Bloom, sugieren que en la anemia aplástica, la habilidad de la médula -- ósea para generar precursores eritroides que producen un aumento en la cantidad de cadenas gamma pueden indicar una disminución -- en el grado de daño de la médula que en pacientes con niveles bajos de hemoglobina fetal total, por otra parte un valor que parece estar correlacionado con la concentración de hemoglobina fetal total, así como con la supervivencia es la cuenta de reticulocitos, por tal motivo en las gráficas 7, 8 se describe la relación que existe entre la hemoglobina fetal total, el porcentaje de reticulocitos y la supervivencia notando que los pacientes --

con reticulocitos bajos presentan una hemoglobina fetal baja y - una supervivencia disminuida, al contrario de los que tienen una hemoglobina fetal alta con los valores de reticulocitos altos y con una supervivencia mayor, lo que se observa mas claramente en la gráfica 9 donde se describe la relación entre el porcentaje - de reticulocitos y la supervivencia.

Cabe hacer mención que los resultados que se presentan acerca de la supervivencia de los pacientes, aspecto de médula ósea así como de los factores predisponentes; fueron obtenidos de los expedientes de los pacientes. (tabla 3, 5)

C A P I T U L O V

C O N C L U S I O N E S

En el grupo de pacientes estudiados con diagnóstico compatible con anemia aplástica, no se presentó ningún caso de hemoglobinuria paroxística nocturna.

La anemia aplástica presenta mayor incidencia en la edad escolar comprendida entre los 8, 11 y 12 años, siendo ligeramente mayor el predominio en el sexo femenino.

Los insecticidas resultaron ser el principal agente predisponente.

El grado de pancitopenia encontrado en los pacientes estudiados, por lo menos en el momento de realizadas las pruebas indican un pronóstico favorable de supervivencia.

En la anemia aplástica, la hemoglobina fetal, así como la cuenta de reticulocitos pueden ser considerados como valores pronósticos.

Se observó también que la hemoglobina fetal total es directamente proporcional al índice de reticulocitos y a la supervivencia.

De acuerdo a los puntos antes mencionados podemos resumir:

La hemoglobinuria Paroxística Nocturna no es un padecimiento pediátrico, sino de la etapa adulta.

La hemoglobina fetal es un factor de pronóstico favorable en la supervivencia de los niños con anemia aplástica.

Según las conclusiones obtenidas en el presente trabajo, se recomienda que a todo niño con diagnóstico de anemia aplástica se les realicen estudios hemolíticos mediados por complemento como son: prueba ácida (HAM), sacarosa e inulina, así como la determinación de hemoglobina fetal y volumen corpuscular medio (VGM).

B I B L I O G R A F I A

1. William, J., et. al., Hematología, 2a edición, España, Salvat editores, 1983.
2. Sánchez, L., Dorantes, S., "Anemia aplástica". Medicina 7, Hematología (1) 474-525.
3. Fairbanks, Virgil, F. Apuntes, 1984.
4. Hórman, A., Berchthold, W., Rhgner, K., "2 Prognosis in acquired aplastic anemia". Acta Haemt. 71: 1984, 81-89.
5. Kagan, W., Ascensao, J.L., Fialu, M.A. "Estudies on the pathogenesis of aplastic anemia". Amer. J. Med. 66: 1966, 444.
6. Davis, S., Rubin, A.D., "Treatment and prognosis in Anemia -- aplastic". Lancet 1: 1972, 871-873.
7. Camitta, B.M., Storb, R., Thomas, E.D., "Aplastic Anemia (second of two parts)." N. Engl. J. Med. 306: 1982, 712.
8. Young, N., "Aplastic anemia research themes and clinical iso-
ves." Progress in haematology, 12: 1981, 227.
9. Gale, R.P., Champlin, R.E., Feig, S.A., Firchen, J.M., -----
"Aplastic anemia biology and treatment". Ann. Inter. Med. 95:
1981 477.
10. Bloom, G. E. and Diamond, L.K., "Prognostic value of fetal he-
moglobin levels in acquired aplastic anemia". New Engl. J. --
Med. 278: 1971, 304.
11. Hershko, C., Ho, W.G., Gale, R.P., Cline, M.J., "Cure for ane-
mia aplastic in PNH by marrow transfuntion from indentical --
twin: Failure of peripheral leucocyte transfution to correct-
marrow aplasia." Lancet 1: 1979, 945-947.

12. Lewis, S.M., "Course and prognosis in A.A." Br. Med. J. 1: -- 1965, 1027.
13. Dessypris, E.N., Clarck, D.A., "Increased sensitivity to complement of erythrocytes and myeloid progenitors in HPN". New-Engl. Journal of medicine, 309, 1983, 690-693.
14. Weller, N. A., March, J.P., Rosenfeld, S.I. y Austen, A.F., - "Affected erythrocytes cell patients with paroximal nocturnal hemoglobinuria are deficient in the complement regulatory -- protein decay acelerating factor". Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A., 80, 1983, 690-693.
15. Frank, A., Oski, J. Laurence, N., Haward, A., Problemas Hematológicos del recién nacido., 3a. edición, ed. Panamericana, México, 1986.
16. Avilés, A., Niz, R.J., HPN y embarazo presentación de 1 caso". Rev. Med. IMSS. No. 4, 20: 1982, 379-382.
17. Fundenberg, H. et. al., Inmunología básica y Clínica. 4a. edición, Editorial el Manual Moderno, México, 1983.
18. Leavell, B.S., Hematología Clínica, 4a. Edición, Interamericana, México, 1978.
19. Maxwell, M., Clinical Hematology, 8th Edition, U.S.A., Lea & Febiber, 1981.
20. Samuel, I.R., Introduction to hematology, New York, Harper & Row Publisher, 1971.
21. Kern, P., Heit, W., Kubanek, B., "Granulocytic progenitor --- cell in A.A., Br. J. Haemtol. 35: 1977, 613.
22. Good, R.A., "A.A. supressor lymphocytes and hematopoiesis",-- New. Engl. J. Med. 296: 1977, 41.

23. Lynch, R.E., Williams, D.W. and Reading, J.C., " The prognosis in A.A. ", Blood, 45: 1975, 517.
24. Rainer, S., Kristine, C., Doney, E.D., " Marrow transplantation with or without donor buffy coat cells for 65 transfused anemia aplastic patients ", 59: No. 2, 1982, 235.
25. Beverly, J., Torok, S., Colin, S., Rainer, S., " In vitro --- test for distinguishing possible immune mediated anemia aplastic from transfusion induced sensitization " ., Blood, 55: - 1980, 1-3.
26. Bruce, M., Thomas, E.D., David, G., " A prospective study of androgens and bone marrow transplantation for treatment of severe anemia aplastic ". Blood., 53: 1979, 504.
27. Thomas, E.D., Rainer, S., " Anemia Aplastic treated by marrow transplantation.", Lancet 1: 1972, 284.
28. Singer, W., Doney, C., and Thomas, E.D., " Coculture studies of 16 untransfused patients with anemia aplastic". Blood, 54: 1980, 772.
29. Chua, E. M., Hoffmann, J., Adams, P.J., and Wendwell, F., --- " Inhibitors of complement derived from the erythrocyte membrane in PNH ". Blood 54: 1980, 772.
30. Rosse, W.F., Dacie, J.V., " Immune lysis of normal human and PNH red blood cells, the sensitivity of PNH red cell to lysis by complement and specific antibody". J. Clin. Invest. 45:--- 1966, 736.
31. Rosse, W.F., Dacie, J.V., " Immunolysis of normal human and PNH red blood cells II. The role of complement, components in the increased sensitivity of PNH red cells to Immunolysis".-- J. Clin. Invest. 45: 1966, 749.

32. Götze., O., Andhans, M. D., Muller, J., Eberhard, M. D., " HPN hemolysis initiated by the C₃ activator system". New. Engl. J. Med. 286: 1972, 180.
33. Takaku, F., Buda, T., Mizoguchi, H., " Effect of peripheral - blood mononuclear cells from anemia aplastic patients on the granulocyte macrophage and erythroide colony formation in sim ples from normal human bone marrow in vitro." . A cooperative work. 55: 1980, 937.
34. Appeebaun, F., Fefer, A., Cheever, A., " Treatment of anemia-aplastic by bone marrow transplantation in identical twins ". A cooperative work. 55, 1980, 1033.
35. Storb, R. Rosst, M. D., Prentice, Ph. D. and Thomas, M.D. --- " Marrow transplantation for treatment of anemia aplastic and analysis of factors associated with graft rejection"., N. Eng. J. Med. 296: 1977, 236.
36. Lewis, Dacie, J.V., " The A.A.-HPN syndrome.", Br. J. Haaematol. 13: 1967, 236.
37. Dacie, J. V., Lewis S.M., Practical Hematology. 4a. edición,- Editorial Grune Stratthot, N. Y., 1985.
38. Li, F. P., Alter, B.P., Nathan, D.G., " The mortality of ac--quired anemia aplastic in children". Blood, 40: 1972, 153.
39. Hansen, H.A., Wenfield, A., " Hemosiderin estimation and side roblast counts in the differential diagnosis of iron deficiency and other anemia". Acta Med. Scand. 165: 1959, 332.
40. Fairbanks, V.F/, Fahey, K.L. and Beutler, Clinical disorders of iron metabolism, 2nd edition, New York, Grune Stratthot, - 1971.

41. Dacie, J.V., Lewis, S. M., " PNH is a stem cell disease that occasionally results in frank aplastic anemia ". Lancet 3, --- 1971, 5.
42. Cartwright, S., Rubin, A. D., Diagnostic Laboratory Haematology. 4a. edición, editorial Grune Stratthot, N. Y., 1985.
43. Sheidi, N. T., Derald, P.S., and Diamond, L. K., " Alkali resistant hemoglobin in aplastic anemia both acquires and congenital types ". New. Engl. J. M. 266: 1962, 117.
44. Bithell, T.C., Wintrobe, M.M., " Drug induced aplastic anemia" Seminars in Hematology, 4: 1967, 194.
45. Bacigulpo, A., Giordano, D., Van Lint, M. T., Vimercati, R., Narmont, A.A., "Bolus metyl prednisolone in severa aplastic anemia "., New. Engl. J. Med. 300: 1974, 501.
46. Stryckmans, P. A., Dumont, J. P., Velu, T. H., Debuncher, L., Cyclosporine in refractory severe aplastic anemia ". N. Engl. J. Med. 310: 1984, 655.
47. Barrat, A.J., Faulle, A., Belitrand, N., Letels, F., Najean, Y., " Bone marrow culture in aplastic anemia"., J. Clin. Pathol., 32: 1979, 660.
48. Panwells, E.K., Velde, J. Te., Hermans, J., Jürgens, H., " Indium chloride bone marrow scintigraphy in aplastic anemia." Scand. J. Haematol. 26: 1981, 81-90.
49. El Feinbein, G. J., Kallman, Ch., Tutscka, P.J., et. al., --- " The inmune system in 40 aplastic anemia patients receiving conventional therapy ". Blood 53: 1979, 652-665.
50. Cooperative Group for the study of aplastic and refractory--- anemias. " Prognosstic factors in acquired aplastic anemia a study of 352 case. " Am. J. Med. 67: 1979, 564-571.

51. Heyn, R.M., Entel, L. J., Tubergen, D.G. " Course of acquired aplastic anemia in children treated with supportive care. " - JAMA 208: 1969, 1372-2378.
52. Rozman, C., Marin, P., Grañena, A. et. al., " Prognosis in acquired aplastic anemia a multivariate statistifical analysis of 80 cases". Scand. J. Haematol., 26: 1981 321-329.
54. Sleijifer, D.T., Malder, N.H., Nueweg, H.O., " The value of-- prognosis indices in aplastic anemia". Blut, 42: 1981, 69.
55. Catherine, N., Gratwohl, A., Speck, B., " Acquired aplastic-- anemia: a PNH like disease? "., Brit. Jour. Haem. 64: 1986,-- 712-718.
56. Camitta, B.M., Storb, R. Thomas, E.D., " Aplastic anemia: pa thogenesis". New. Engl. Journal of Medicine., 306: 1982, ---- 645-652.
57. Gale, R.P., Champlin, R.E., Feig, S.A., Fitchen, J.H., " Aplag tic anemia biology and treatment"., Annals of internal Medici ne., 95: 1981, 477-494.
58. Pangburn, M.H., Schinciber, R.D., " Deficiency of an erythro- cyte membrane protein with complement regulatory activity in HPN". Medical Sciences, 80: 1983, 5340-5434.
59. Tumen, J., Rling, L. B., Fay., et al., " Complement sensitivi ty of paroxismal nocturnal hemoglobinuria bone marrow cells." Blood. 55: 1980, 1040-1046.
60. Bustelo, P. M., Abrev de Miani, M.S., Peñalver, S.A., " Ane- mia aplastica adquirida en pediatria: análisis de ochenta y - un casos. Aspectos clinicos hematologicos generales." Sangre, 24: 1979, 252.

61. Iparraguirre, J., Weinstein, B., Landoni, M. A., "Evaluación clínica y hematológica de 82 pacientes afectados de anemia aplásica (1958-1977)". Medicina, 37: 1977, 491.
62. Rosse, W.F., Adams J.P., Thorpe, A. M., "The population of cells in HPN of intermediate sensitivity to complement lysis-- significance and mechanism of increased immune lysis". Br. J. Haematol. 24: 1974, 181-190
63. Rosse, W.F., "Variation in the red cells in HPN", Br. J. Haematol. 24: 1973, 327-342.
64. Jenkins de Jr., Cristenson, W. M., Engle, R. L. Jr., "Detection of complement components on the unlysed erythrocytes--- from acid hemolysis and thrombin test reactions in HPN.", J. Clin. Inv. 45: 1966, 796-802.
65. Oni, S.B., Osunkoya, B.O., Luzzattol., "Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: evidence for monoclonal origin of abnormal red cells." Blood, 36: 1970, 145-152.
66. Jenkins de Jr., "Diagnostic test for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria.", N. Engl. J. Med., 275: 1966, 157-157.
67. Clarck, D.A., Butler, S.A., Braren, V., Hartmann V., "The Kidneys in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria". Blood, 57: 1981, 83-89
68. Hatmann, R.C., Jenkins, D., Arnold, A.B., "Diagnostic specificity of sucrose hemolysis test for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria"., Blood. 35: 1970, 462-475.

A P E N D I C E " A "

P R E P A R A C I O N D E R E A C T I V O S

a) PRUEBA DE LA SACAROSA.

1. Preparación del amortiguador de Fosfatos (PBS); pH;7.2-7.4
 - 500 ml de agua desionizada
 - Poner al matraz o recipiente la barra magnética y agitar.
 - Agregar 4 g. de NaCl al agua en el recipiente.
 - Agregar 0.10 g. de KCl a la solución en el recipiente.
 - Agregar 0.10 g. de K_2HPO_4 (fosfato de potasio monobásico)- a la solución en el recipiente.
 - Agregar 1.08 g. de fosfato de sodio dibásico heptahidrato a la solución en el recipiente.
 - Mezclar hasta disolver todo completamente.
 - Quitar la barra magnética de la solución y tomar el pH, éste debe ser entre 7.2-7.4.
 - Guardar la solución en un recipiente bien rotulado en el refrigerador de 2 a 8°C.

2. Preparación de la solución de sacarosa al 9.2%.
 - Pesar 2.3 g. de sacarosa Q. P.
 - Poner la sacarosa ya pesada en un matraz de 25 ml aforado.
 - Aforar con ayuda de agua desionizada.

NOTA: Esta solución se prepara en el momento de que se va a realizar la prueba.

b) PRUEBA DE LA INULINA

1. Preparación de Inulina al 0.1 %

- Pesar 10 g. de Inulina comercial
- Poner en un matraz aforado de 100 ml
- Aforar con ayuda de agua desmineralizada.

c) PRUEBA DE LA HEMOLISIS ACIDA

1. Preparación de L-cisteina al 10%

- Pesar 0.5 g. de clorhidrato de L-cisteina
- Colocarlos en un vaso de precipitado de 50 ml
- Agregar 4.0 ml de agua desionizada.
- Disolverla perfectamente.

NOTA: Esta solución se prepara en el momento de realizar la prueba.

d) PRUEBA DE LA HEMOGLOBINA FETAL

1. Preparación de Sulfato de amonio al 50%

- Pesar en balanza analítica o granataria 250 g. de sulfato de amonio R.A. Mallincroot o Merck.
- Colocar los 250 g. de sulfato de amonio ya pesados en un matraz erlenmeyer de 500 ml poco a poco dejando intervalos de tiempo para permitir una mayor disolución en 250 ml de agua desionizada.

- Dejar reposar por 2 a 3 días a temperatura ambiente.
 - Filtrar después de 2 a 3 días en lana de vidrio o con doble papel filtro grueso, poco a poco.
2. Preparación de sulfato de amonio saturado al 50% ácido.
- Medir 250 ml de sulfato de amonio saturado preparado anteriormente y depositarlos en un matraz erlenmeyer de 500-- ml.
 - Agregar 1.25 ml de ácido clorhídrico 10 N.
 - Aforar a 500 ml con agua desmineralizada y mezclar.
 - Rotular la solución y guardar.

e) PRUEBA DE LA HEMOSIDERINA

1. Preparación del reactivo de Azul de Prusia.
- Medir exactamente 1 ml de ácido clorhídrico.
 - Colocar el ácido medido en un matraz aforado de 100 ml.
 - Agregar hasta el aforo 100 ml de agua desmineralizada.
 - Guardar la solución en un frasco y etiquetar correctamente
 - Pesar 1 g. de ferricianuro de potasio Q.P.
 - Poner el g. de ferricianuro pesado en un matraz aforado de 100 ml.
 - Agregar hasta el aforo 100 ml de agua desmineralizada
 - Guardar la solución en un frasco y etiquetar perfectamente.

NOTA: Para llevar a cabo la tinción se mezclan en partes iguales el ácido clorhídrico preparado y la solución de ferricianuro.

2. Preparación de Safranina al 0.1%

- Medir 0.1 ml de safranina
- Poner en un matraz aforado de 100 ml
- Llevar hasta el aforo con agua desmineralizada.

f) PREPARACION DEL MATERIAL LIBRE DE HIERRO.

1. Introducir perfectamente el material de vidrio en ácido-Nítrico al 50% con agua destilada durante 24 a 72 horas.
2. Sacar y enjuagar con agua de la llave abundantemente----

NOTA: Tener cuidado de no quemarse con el ácido, de preferencia emplear guantes.

3. Enjuagar abundantemente con agua destilada.
4. Enjuagar una sola vez con agua desmineralizada.
5. Dejar escurrir sobre papel filtro.