

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Estudios Superiores



PRUEBAS DE HEMOLISIS EN PACIENTES CON VALVULOPLASTIA DEL HOSPITAL DE CARDIOLOGIA DEL CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI DEL I.M.S.S.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A :

Norma Juana Montes de Oca Medina

MEXICO, D.F.

1993

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

INDICE

RESUMEN	1
MARCO TEORICO	3
A. Generalidades Anatómicas	3
B. Cardiopatías Valvulares	9
Estenosis Mitral	9
Insuficiencia Mitral	11
Síndrome del Prolapso de la Válvula Mitral	13
Estenosis Aórtica	14
Insuficiencia Aórtica	15
C. Válvulas Cardíacas	16
Características de Flujo	17
Prótesis de Perfil Bajo	19
Prótesis de Perfil Alto	20
Válvulas Biológicas	20
D. Traumatismo de Flujo Sanguíneo por Implante Valvular	25
E. Principales Estudios Hematológicos Realizados después de un Implante Valvular	27
F. Efectos de Perfusión en Sangre	39
G. Complicaciones de la Válvulas Cardíacas Implantadas	41
H. Anemias Hemolíticas	43
Clasificación de las Anemias Hemolíticas	44
Hemólisis Intravascular y Extravascular	49
FUNDAMENTO DEL TEMA	51
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	52
OBJETIVOS	52
HIPOTESIS	54
MATERIAL	55

METODO	64
A. Características de los Pacientes	64
B. Obtención de la Muestra Sanguínea y Preparación del Suero	65
C. Evaluación Hemolítica	68
DISEÑO ESTADISTICO	82
RESULTADOS	84
DISCUSION DE RESULTADOS	97
CONCLUSIONES	102
PROPUESTAS Y RECOMENDACIONES	104
ANEXOS	105
A. Valores de Referencia	105
B. Preparación del Hemolizado	106
C. Linealidad Espectrofotométrica	107
D. Puntos Isosbéticos	108
E. Equipo Automático Celldyn 3000	108
F. Equipo Automático Express 550	109
G. Abreviaciones y Símbolos	110
BIBLIOGRAFIA	113

INDICE DE FIGURAS, CUADROS Y GRATICAS

FIGURA 1.	Localización Anatómica del Corazón	7
FIGURA 2.	Localización de las Válvulas Cardíacas ...	8
FIGURA 3.	Los tres sitios de obstrucción del flujo sanguíneo.....	18
FIGURA 4.	Características y Modelos las Principales Válvulas	21
FIGURA 5.	Método Cruzado	73
FIGURA 6.	Equipo Automátizado Celldyn 3000	119
FIGURA 7.	Equipo Automátizado Express 550	120
CUADRO I	Clasificación de las Enfermedades	46
CUADRO II	Distribución " t de student".....	82
CUADRO III	Análisis de Varianza ANDEVA	82
CUADRO IV	Datos Clínicos de los grupos estudiados ..	85
CUADRO V	Valores Medios de la Biometría Hemática ..	86
CUADRO VI	Valores Medios de las Diferentes Determinaciones Realizadas para la Evaluación Hemolítica	87
CUADRO VII	Resultados de la Aplicación de la "t de student" a los GRUPOS II y III	87
CUADRO VIII	Aplicación del Análisis de Varianza (ANDEVA) a cada una de las determinaciones de hemólisis del GRUPO III en las diferentes etapas del estudio	88

CUADRO IX	Morfología Eritrocitaria	90
GRAFICA I	Morfología Eritrocitaria	91
GRAFICA II	Hemoglobina Libre en Pacientes con Implante Valvular	92
GRAFICA III	Metahemoglobina en Pacientes con Implante Valvular	93
GRAFICA IV	Pigmento de Metahemoglobina en Pacientes con Implante Valvular	94
GRAFICA V	Linfocitos Totales en Pacientes con Implante Valvular	95
GRAFICA VI	Niveles de Deshidrogenasa Láctica en Pacientes con Implante Valvular	96
GRAFICA VII	Linealidad Espectrofotométrica	112
GRAFICA VIII	Puntos Isobésticos	112

RESUMEN

La recuperación clínica de la hemólisis eritrocitaria no ha sido aún establecida en los pacientes con prótesis valvular mecánica. Existe aún controversia en el grado de hemólisis producido por estas causas.

El objetivo del presente trabajo fue demostrar la hemólisis en la prótesis valvular crónica y la hemólisis aguda postbomba de circulación extracorpórea mediante la determinación de Hemoglobina Libre, Metahemoglobina y Pigmento de Metahemoglobina, ya que son hasta el momento los estudios de hemólisis químicamente más sensibles.

Fueron seleccionados prospectivamente 20 pacientes a los que se les implantó prótesis valvular tipo Sorín, realizándose un estudio Longitudinal de los analitos Hemoglobina libre, Metahemoglobina, Pigmento de Metahemoglobina, Deshidrogenasa Láctica y Biometría Hemática Completa en los siguientes períodos: Prebomba, 10, 30, 70 y 80 días postbomba, con una edad media de 43 años, sometidos a cirugía con una media de 3 horas y empleándose una Bomba Extracorpórea COBE de flujo continuo.

Fueron incluidos 30 pacientes portadores de válvula mecánica y 70 sujetos sanos empleándose un estudio tipo Transversal.

La hemólisis se encuentra presente de acuerdo a la cuantificación de la Hemoglobina Libre, Metahemoglobina y Pigmento de Metahemoglobina en los pacientes portadores de la válvula cardíaca en y forma crónica en todos los sujetos sometidos a Bomba hasta el 8o día que duró el estudio.

Se obtuvo como resultado un incremento de las determinaciones durante el implante: Hemoglobina libre de 2.73 a 25.31 (g/dl), Metahemoglobina de 0.18 a 0.27 (g/dl), Pigmento de Metahemoglobina de 0.49 a 0.77 (%), Deshidrogenasa Láctica de 154.45 a 474.80 (u/ml).

Como dato no informado en la literatura se demostró linfocitopenia significativa ($p= 0.005$) en el período postbomba, el cual se atribuye a un posible secuestro Linfocítico debido al equipo utilizado durante la cirugía como lo es el Oxigenador de Burbuja, contra el estrés propio del paciente.

Se excluyeron los pacientes que presentaran las pruebas de Aloanticuerpo positivas.

MARCO TEORICO

A. Generalidades Anatómicas:

El corazón es un músculo hueco que circunscribe cavidades en las cuales circula la sangre. Cuando se distiende (diástole), el corazón atrae hacia sí la sangre que circula en la venas. Cuando se contrae (sístole) expulsa la sangre hacia las arterias: aorta o arteria pulmonar. Está formado por un músculo con propiedades particulares, el miocardio, tapizado interiormente por el endocardio y exteriormente por el epicardio. El corazón está rodeado por el pericardio, conjunto fibroso que lo separa de los órganos vecinos.

Está situado en el tórax [Fig. 1], detrás de la pared esternocondrocostal, en la parte anterior. Entre los dos pulmones, rodeado por sus pleuras, por encima del diafragma, delante de la columna vertebral. Se proyecta en el segmento comprendido entre el 4o y 8o procesos espinosos de las vértebras torácicas (vértebras cardíacas). Situado en la línea mediana se desarrolla sobre toda la izquierda de esta línea y ligeramente hacia la derecha (1).

El corazón se divide en cuatro cavidades dos aurículas y dos ventrículos. La aurícula izquierda recibe sangre oxigenada de los pulmones y la impulsa al ventrículo izquierdo, que al contraerse la obliga a pasar por la aorta y las arterias para

distribuirse en los tejidos corporales. La aurícula derecha recibe la sangre después de haber pasado por todos los tejidos y cedido gran parte de oxígeno, la sangre después pasa al ventrículo derecho y a los pulmones para ser oxigenada. Los mecanismos especiales del corazón es conservar el ritmo cardíaco y transmitir los potenciales de acción a toda la musculatura del órgano para iniciar su contracción.

El corazón está formado por tres tipos principales de músculo: Músculo auricular, Músculo ventricular y fibras especializadas para excitación y conducción. Los tipos de músculo auricular y ventricular se contraen de una manera muy similar a como lo hacen las fibras musculares esqueléticas. Las fibras especializadas excitatorias y conductoras sólo se contraen débilmente, porque contienen muy pocas fibras contráctiles; por el contrario, brindan un sistema excitatorio para el corazón y un sistema de transmisión para la rápida conducción de impulsos a través del mismo.

En el corazón se encuentran unas estructuras que controlan el flujo de la sangre hacia el interior y exterior del corazón, las cuales reciben el nombre de **Válvulas Cardíacas** [Fig. 2].

Las válvulas principales a saber son cuatro:

1. Aurículoventricular izquierda (bicúspide o mitral), entre aurícula izquierda y el ventrículo izquierdo;
2. Aurículoventricular derecha (Tricúspide), válvula situada entre la aurícula derecha y el ventrículo derecho del corazón;
3. Aórtica localizada en el orificio de la aorta, compuesta por tres valvas o segmentos semilunares que cierran el el orificio aórtico en el ventrículo izquierdo del corazón. Está válvula impide el flujo retrógrado hacia el ventrículo izquierdo.
4. Pulmonar localizada en el orificio del tronco pulmonar.

Las válvulas aurículoventriculares evitan el flujo retrógrado de sangre desde los ventrículos a las aurículas durante la sístole, las valvas semilunares impiden el flujo retrógrado de la aorta y la pulmonar hacia los ventrículos durante la diástole. Todas estas válvulas se cierran y se abren pasivamente; se cierran cuando un gradiente de presión en sentido retrógrado las impulsa hacia atrás, y se abren cuando un gradiente de presión en sentido anterógrado manda sangre hacia adelante. Por motivos anatómicos evidentes las finas y delgadas válvulas

aurículoventriculares casi no necesitan flujo retrógrado para cerrarse, mientras que las válvulas semilunares, mucho más fuertes requieren un reflujo potente durante una milésima de segundo (2).

Los músculos papilares se encuentran unidos a las hojuelas de las válvulas aurículoventriculares por las cuerdas tendinosas. Estos músculos se contraen cuando las paredes ventriculares los hacen; no ayudan a cerrar las válvulas. De hecho tiran de las hojuelas de las válvulas en dirección de los ventrículos impidiendo que puedan hacer prominencia excesiva hacia las aurículas durante la contracción ventricular. Si se rompe una cuerda tendinosa; o si uno de los músculos papilares se paraliza, la válvula hará intensa prominencia en la aurícula, a veces hasta el punto de permitir escape considerable de sangre y originar incapacidad cardíaca grave (3).

Figura 1. Localización y Anatomía del Corazón.

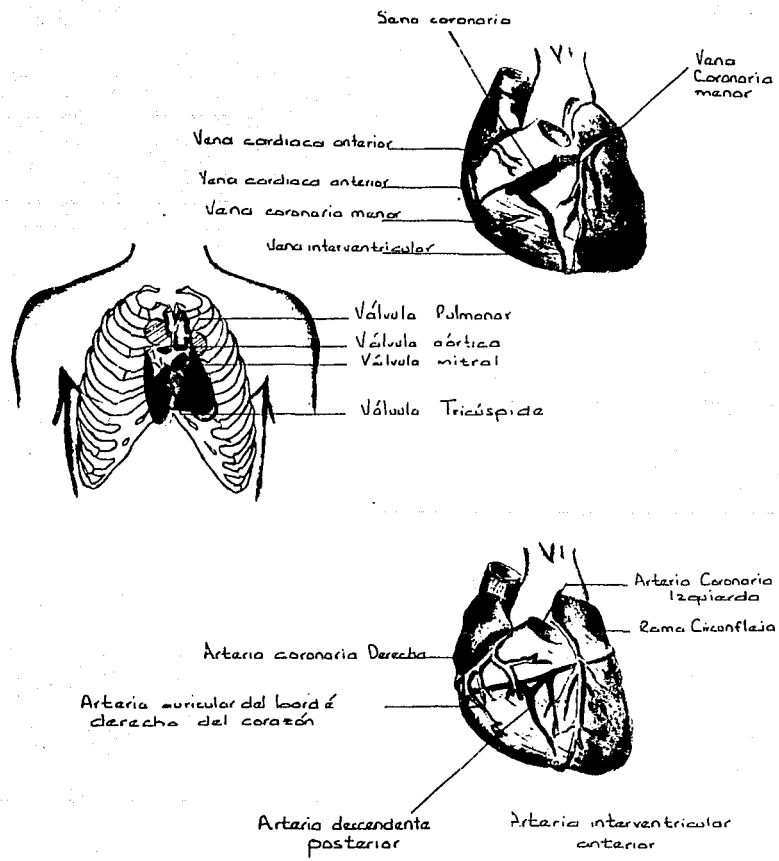
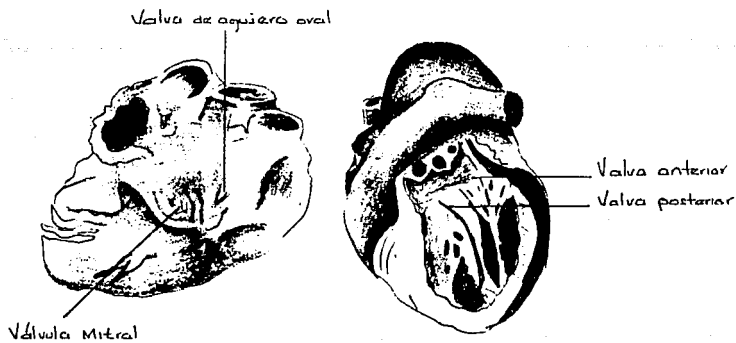
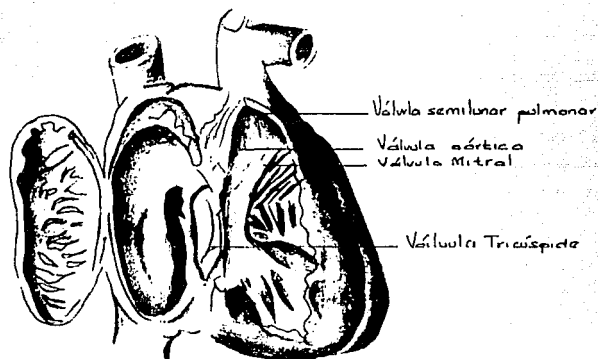


Figura 2. Localización de las Válvulas Cardíacas.



B. CARDIOPATIAS VALVULARES:

Entre las patologías en donde se puede realizar un implante valvular cardiaco se encuentran principalmente la Estenosis Mitral, Estenosis Aórtica, Insuficiencia Mitral, Insuficiencia Aórtica, Síndrome de prolapso de la válvula Mitral entre otras anomalías (4).

1. ESTENOSIS MITRAL

a) Etiología: La causa prominente de estenosis mitral (MS, mitral stenosis) es la fiebre reumática. Con menos frecuencia su forma es congénita y se observa casi exclusivamente en lactantes y en niños pequeños. Rara vez es una complicación de carcinoma maligno, lupus eritematoso diseminado, artritis reumatoide y mucopolisacaridosis del fenotipo de Hunter-Hurley. Se ha sugerido que varios virus, en especial el virus Coxsackie, pueden ser responsables de cardiopatías valvulares crónicas. Puede haber depósito de amiloide en las válvulas reumáticas, lo que contribuye a la obstrucción al vaciamiento de la aurícula izquierda.

La fiebre reumática produce cuatro formas de fusión del aparato mitral que conducen a estenosis: Comisural, Cuspídea, Cordal y Combinada.

b) Tratamiento Quirúrgico: Una vez que los síntomas se hacen más graves, la enfermedad evoluciona con rapidez hacia la muerte, debe efectuarse, debe efectuarse la operación en pacientes sintomáticos con estenosis moderada o grave (un tamaño del orificio de la válvula mitral $< 1.0 \text{ cm}^2$ de superficie corporal). Las consecuencias de la cirugía valvular, en particular sustitución valvular, son tan profundas que se recomienda cateterismo y angiografía preoperatoria en pacientes con estenosis mitral.

Valvuloplastia Mitral con Globo. Esta operación constituye una alternativa al tratamiento quirúrgico de estenosis mitral. Consiste en hacer avanzar un cateter de flotación con un pequeño globo a través del tabique interauricular, ensanchando la abertura y haciendo avanzar un globo grande (23 a 25 mm) a través del orificio mitral, e inflarlo al nivel del propio orificio. La separación de las comisuras y la fractura de calcio nodular son los mecanismos a los que se atribuye la mejoría de la obstrucción valvular. Este procedimiento no corrige la cicatrización ni el acortamiento de las cuerdas tendinosas ni de otras estructuras subvalvulares.

2. INSUFICIENCIA MITRAL

a) Etiología: El aparato de la válvula mitral comprende anillo mitral, válvulas mitrales, cuerdas tendensiosas y músculos papilares. Las anomalías de cualquiera de estas, causa Insuficiencia Mitral (MR, mitral regurgitación).

La MR debido a la afección de las válvulas se presenta más comúnmente en cardiopatía reumática crónica y es más frecuente en hombres que en mujeres. Es una consecuencia del acortamiento, rigidez, deformidad y retracción de una o ambas válvulas de la válvula mitral, así como acortamiento y fusión de las cuerdas tendensiosas en músculos papilares.

Anomalías del Anillo Mitral. En un adulto normal el anillo mitral mide 10 cm. de circunferencia. Durante la sístole la contracción del músculo ventricular que lo rodea hace que constriña y esto atribuye al cierre de la válvula. La calcificación idiopática del anillo mitral es uno de los trastornos cardíacos más comunes en necropsia, este cambio degenerativo tiene escasa consecuencia funcional.

Anomalías de la Cuerdas Tendensiosas. Son Causa importante de la MR. Las cuerdas pueden ser congénitamente anormales; la ruptura puede ser espontánea, o preservarse como consecuencia de endocarditis infecciosa, traumatismo, fiebre

reumática, proliferación mixomatosa o osteogénesis imperfecta.

Afectación de los Músculos Papilares. Las enfermedades de los músculos papilares del ventrículo izquierdo a menudo causan MR. Estos músculos reciben riego por la porción terminal de la circulación coronaria, son vulnerables a la isquémia, y cualquier trastorno en el riego coronario, provoca disfunción de músculos papilares.

La isquémia de los músculos papilares es causada por arteriopatía coronaria, pero también puede presentarse en anemia grave, shock, artritis coronaria y origen anómalo en la arteria coronaria izquierda.

b) Tratamiento Quirúrgico: Debe tomarse en cuenta los riesgos inmediatos y a largo plazo. La mortalidad quirúrgica depende del estado hemodinámico y clínico del paciente, en particular de la función del ventrículo izquierdo, presencia de trastornos asociados como enfermedad renal, hepática y pulmonar, así como de la experiencia del equipo quirúrgico. Parece no depender de forma significativa la utilización de la prótesis válvular ampliamente utilizada mística o mecánica.

3. SINDROME DE PROLAPSO DE LA VALVULA MITRAL

a) Etiología : El síndrome del prolapso de la válvula mitral (MVP, mitral valvular prolapse). Es un síndrome clínico variable, resulta común de diversos mecanismos patógenos del aparato de la válvula mitral. Se identifica como una de las anomalías valvulares cardíacas más prevalentes. Barlow y col., distinguieron entre "abombamiento" y "prolapso" de la mitral. En condiciones normales, la válvula mitral abomba ligeramente en el interior de la aurícula izquierda y una exageración se le denomina "abombamiento de la válvula mitral". Una válvula flotante es una forma extrema de abombamiento. El MVP se presenta cuando los bordes de las valvas no captan y causan Insuficiencia Mitral. Con la rotura de las cuerdas la valvula mitral prolapsada "flota".

b) Tratamiento Quirúrgico: En enfermos con MVP que hayn tenido algún transtorno cerebral y en quienes no sea evidente ninguna otra causa se debe administrar tratamiento anticoagulante, fármacos que interfieren con la función plaquetaria , como aspirina y dipiridamol.

El MVP se trata de un transtorno benigno y que la mayoría de los pacientes que lo sufren permanecen asintomaticos durante toda su vida.

4. ESTENOSIS AORTICA

a) Etiología: La obstrucción de la vía de salida del ventrículo izquierdo se localiza más comúnmente en la válvula aórtica; sin embargo también puede haber obstrucción por arriba de la válvula (estenosis supravalvular), por debajo de la válvula (estenosis aórtica subvalvular fija).

La estenosis aórtica adquirida o reumática se debe a adherencias y fusión de las comisuras de las valvas con vascularización de las valvas y del anillo valvular, lo cual causa tracción y rigidez de los bordes libres de las valvas, con nódulos calcificados presentes en ambas superficies y un orificio que queda reducido a una pequeña abertura en la estenosis aórtica calcificada degenerativa, las valvas están inmóviles por depósitos de calcio a lo largo de sus líneas de flexión en sus bases.

b) Tratamiento Quirúrgico: El reemplazo con buenos resultados de la válvula aórtica ha permitido mejoría sustancial, clínica y hemodinámica en pacientes con estenosis o lesiones combinadas. La valvuloplastia con globo es útil en estos pacientes en estado crítico.

5. INSUFICIENCIA AORTICA

a) Etiología: La insuficiencia aórtica (Aortic regurgitation, AR) puede ser causada por una enfermedad primaria de las valvas aórticas o de la pared de la raíz aórtica, o por ambos procesos. Entre los pacientes con AR pura que son sometidos a reemplazo valvular a aumentado uniformemente el porcentaje con enfermedad de la raíz aórtica durante los últimos años. La fiebre reumática es una causa común de enfermedad primaria de la válvula que provoca insuficiencia. Las valvas se infiltran en el tejido fibroso y se contraen, un proceso que evita la oposición de las valvas durante la diástole y que por lo general causa reflujo al ventrículo izquierdo por un orificio en el centro de la válvula. La fusión asociada de las comisuras pueden también restringir la apertura de la válvula, lo que da por resultado una combinación de Estenosis aórtica e Insuficiencia aórtica.

b) Tratamiento Quirúrgico: Es difícil en ocasiones la decisión para recomendar el reemplazo de la válvula en los pacientes con AR grave. La operación debe ser diferida en pacientes asintomáticos con función normal del ventrículo izquierdo y se debe de recomendar en pacientes sintomáticos. Los enfermos asintomáticos con alteración en la función

ventricular izquierda deben ser tratados individualmente (4).

C. VALVULAS CARDIACAS

Las válvulas protésicas deben cumplir con las siguientes características (5):

1. No deben inducir embolia.
2. Deben ser químicamente inerte y no dañar los elementos sanguíneos.
3. No debe ofrecer resistencia al flujo fisiológico.
4. Debe cerrar rápidamente (menor que 0.05 segundos).
5. Debe permanecer cerrada durante la fase apropiada del ciclo cardiaco.
Debe abrirse y cerrarse de inmediato en respuesta a los cambios en el gradiente de presión.
6. Debe tener una estructura duradera y una figura geométrica.
7. Esta debe ser colocada o insertada en un sitio fisiológi-

co (generalmente el sitio anatómico normal).

8. Debe permanecer fijo.
9. No debe molestar al paciente, tal como ser demasiado ruidosa.
10. Debe ser técnicamente práctica al colocarla.

Características de Flujo:

En las válvulas con bola o con disco en un canastillo, el ocluser esta contenido en un canastillo, cuando la válvula esta abierta, se apoya en un anillo cuando la válvula se cierra. La sangre debe fluir en forma centrifuga al rededor de la bola o del disco, es inevitable la obstrucción del flujo laminar central.

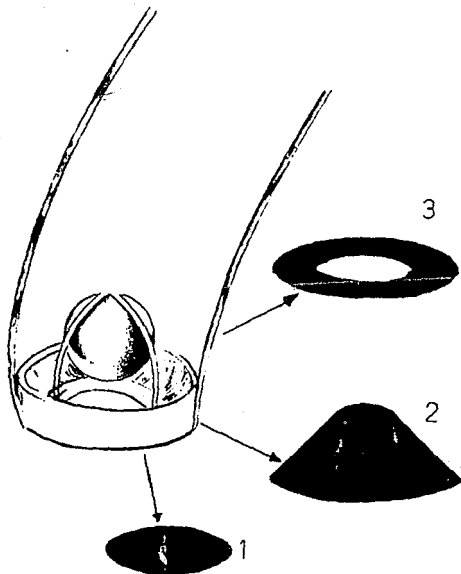
Las tres localizaciones criticas para el flujo de sangre hacia adelante en valvulas de oclusión central (6) [Fig.3] son:

1. El orificio principal o de flujo interno en el asiento de la válvula.
2. El orificio secundario o el flujo creado por el cono

truncado desde la circunferencia del asiento de la válvula al perímetro del ocluser cuando la válvula se abre.

3. El orificio terciario que es el área entre el perímetro del ocluser y los tejidos vecinos.

Figura 3 . Los tres sitios de obstrucción del flujo sanguíneo hacia adelante a través de una válvula de bola enjaulada.



Con base en esto se han desarrollado prótesis mecánicas y biológicas. Dentro de las mecánicas tenemos las de perfil bajo que incluyen a las prótesis de disco (tilting disc) y a las bivalvas; y las de perfil alto que son las de "jaula" y "bola" (caged-ball) y las de "jaula y disco" (called-disc). De las biológicas contamos con las válvulas de porcino y de bovino.

Prótesis de Perfil Bajo:

Este tipo de prótesis se diseño para cavidades pequeñas. La prótesis de Björk-Shiley tiene una estructura de estelite, un anillo cubierto de teflón y de un disco de carbón pirolítico que abre a 60 grados. Es la más indicada cuando la cavidad donde se implantará es pequeña y el paciente puede tolerar bien la anticoagulación. Björk informa una sobrevida del 88% a 5 años y del 75% a los 10 años en posición aórtica. En posición mitral la sobrevida a 5 y 10 años fue del 75% y 69% respectivamente. El problema principal de esta prótesis es la trombosis valvular catastrófica que tiene una mortalidad superior al 80%.

La prótesis de Björk-Shiley Monostrut es el diseño de prótesis de perfil bajo más reciente, esta hecha de una sola pieza del material Haynes-25 con lo que la fractura de la estructura se ha eliminado. Dentro de esté grupo

encontramos otras válvulas de gran importancia como lo son la válvulas de Lillehei-Koster y de Medtronic-Hall.

Prótesis de Perfil Alto:

Este tipo de prótesis ha sido más utilizada, consiste en un obturador que es una esfera, colocada dentro de una jaula (called-ball) en donde se desplaza por gradientes de presión. El flujo anterógrado es centrífugo a la bola (por lo que no tiene flujo central) pero el gradiente transprótesico es clínicamente aceptable. La prótesis de Starr-Edwards es el prototipo. Su jaula esta hecha a base de estelite, el obturador (la esfera) es de silastic y se coloca sobre un anillo de teflón y polipropileno. El flujo que genera es centrífugo en relación a la esfera, por lo que el flujo laminar central invariablemente es obstruido. Esta válvula presenta una excelente durabilidad. Tiene una sobrevida libre de disfunción del 73% a los 10 años en posición mitral y 71% en posición aórtica.

Válvulas Biológicas:

En 1965 Binet implantó una válvula de porcino a un paciente con Estenosis Aórtica, desde entonces los xenotransplantes valvulares se consideraron una alternativa importante en el reemplazo valvular.

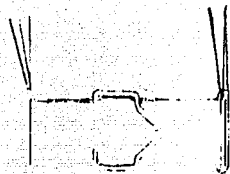
En la actualidad la bioprótesis de Hancock y la de Carpentier-Edwards han sido las más utilizadas. La primera prótesis es una válvula aórtica de porcino tratada con glutaraldehído montada en un anillo flexible de polipropileno y estelite. Dicha válvula ha demostrado un funcionamiento normal de 83% a 5 años en posición aórtica y de 81% en posición mitral.

La frecuencia de fenómenos tromboembólicos en pacientes sin anticoagulantes de 1.2% por paciente año en posición aórtica y de 1.4% en posición mitral. Las Bioprótesis son más fisiológicas, generan un flujo central, las complicaciones tromboembólicas sin anticoagulación oral son menores, no son ruidosas y son económicas, por lo que para el paciente que cursa con alguna contraindicación para la anticoagulación este tipo de prótesis es la más indicada. Sin embargo la degeneración tisular, la calcificación y la subsecuente disfunción es una desventaja en relación a las prótesis mecánicas ya que estas han probado una durabilidad mayor (7).

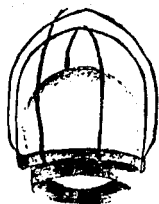
En la figura 4 se muestran las principales válvulas y sus características más importantes (6).

Figura 4. Modelos de Válvulas Cardíacas.

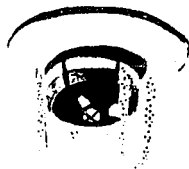
Válvula original de Hufnagel
de acrílico con bola enjaulada.



Válvula Aórtica de Harken con
bola enjaulada, con bola de Si-
lastic y caja de acero inoxidable.
El objetivo de la caja ex-
terna era evitar el contacto de
la pared aórtica con laja inter-
na y el ocluser, además de evi-
tar la obstrucción supraórtica
en una aorta estrecha.



Válvula Mitral Starr-Edwards
Modelo 6400 con caja de estelita
parcialmente cubierta con tela
y bola hueca de stellita. Una
simple capa de tela de polipro-
pileno, de tejido poroso.



Válvula Starr-Edwards Modelo 6520 con disco de poliuretano de alto peso molecular, caja de stellita y anillo de sutura compuesto de tela de teflón y poliuretano. El disco tiene un delgado anillo de titanio.



Válvula Wada-Cutter, con anillo de titanio, anillo de sutura de tela de teflón y disco de teflón (Halon) mantenido en su lugar por medio de ranuras.



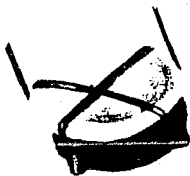
Válvula Björk-Shiley, con disco de carbón pirolítico, de caja de stellite y anillo de sutura de tela de teflón. La válvula se abre y se administra con un anillo metálico, radiopaco, de tantalio incrustado en el disco.



Válvula Smeloff-Cutter con bola de silastic, caja de doble Titanio y anillo de sutura de tela de Teflón. La bola pasa a través del anillo valvular para ser contenida por la caja, que permite utilizar una bola más pequeña. Los extremos de ambas cajas están abiertas para eliminar zonas de posible depósito de fibrina.



Válvula de Kay-Suzuki, con disco silastic, caja de titanio y anillo de sutura de tela de Teflón recubierto de una película de poliuretano para prevenir el tromboembolismo.



D. TRAUMATISMO DEL FLUJO SANGUINEO POR IMPLANTE VALVULAR :

Después de la inserción de la válvula homográfica y xenográfica la hemólisis es subclínica y se manifiesta por una reducción leve de la haptoglobina sérica. La hemólisis causada por las válvulas protésicas es debido a un stress anormal, turbulencia y colición de eritrocitos con superficies extrañas. Los factores que contribuyen al trauma de las células rojas son la variación de la formación de coartaduras de la esfera paravalvular, gradientes valvulares, esfera de stellite como comparación a las válvulas de balón de silicón, válvulas de cubierta cerrada, doble prótesis mitral. En las válvulas de Bjork-Shiley, Homográficas y Xenográficas el flujo central produce una turbulencia diminuta, la hemólisis es moderada y carece de significancia clínica (8).

Una hemólisis significativa puede ser fatal, ésta es más común en las válvulas mecánicas artificiales que en bioprótesis. Sin embargo se ha notificado que las hetero y homo bioprótesis también causan hemólisis. En estudios realizados por Sezai Y. et al. (1984) obtuvieron que el reemplazo de las válvulas aórticas con la válvula de St. Jude Medical causa una hemólisis mayor que un doble reemplazo de válvula mitral y aórtica. Y la válvula porcina Xenográfica mostró una hemólisis pequeña.

La hemólisis ocurre en todas las válvulas protésicas.

Las posibles causas de hemólisis (9) después del reemplazo valvular son:

1. Taponamiento de la Válvula.
2. Daño Valvular.
3. Material de la Válvula.
4. Turbulencia causada por el incremento de la resistencia de flujo el cual es el resultado del incremento del gradiente de presión o el decremento del área del orificio efectivo.
5. Regurgitación Transvalvular.
6. Grieta paravalvular.
7. Variación del Balón.
8. Fenómeno Autoinmune.

E. PRINCIPALES ESTUDIOS HEMATOLOGICOS REALIZADOS DESPUES DE UN IMPLANTE VALVULAR :

Se ha hecho una diversidad de investigaciones en cuanto al estado hematológico que cursan los pacientes que han recibido un implante de prótesis valvular cardíaco; con el fin de minimizar efectos adversos que pueda conllevar el implante.

Desde 1950 cuando Hufnagel implantó una prótesis mecánica de balón en la aorta descendente para tratar una insuficiencia aórtica severa, el desarrollo de los sustitutos valvulares cardíacos ha evolucionado considerablemente (7). La primera valvulotomía por medio de un catéter cortante la realizó en México el doctor Victor Rubio Álvarez del Departamento de Hemodinámica del Instituto Nacional de Cardiología en el año de 1959 (10).

En 1960 Harken y posteriormente Starr iniciaron la cirugía del reemplazo valvular con lo que mejoró la sobrevida de los pacientes con valvulopatías. Desde entonces han sucedido múltiples modificaciones y cambios en el diseño de los diferentes tipos de prótesis para obtener una estructura que se pueda considerar ideal y que a pesar de todo esfuerzo esto no ha llegado a ser posible aún (11). Durante los 70s las bioprótesis cardíacas mostraron un rápido crecimiento popular, ya que estas ofrecían poco riesgo a

ciertas complicaciones relacionadas a la válvula. La disposición de la cirugía cardíaca oscila a favor de la bioprótesis, la cual ofrece una disminución de sucesos posteriores en relación a la válvula, en el gasto del potencial y disminución de su durabilidad (11).

Moisey C.U. et al., informaron (1972) de un caso de anemia hemolítica severa en un niño que tenía prótesis valvular asociada a insuficiencia mitral. La anemia ocurrió después de intentar reparar la válvula mitral y fue corregida por el reemplazo. La anemia hemolítica en enfermedades cardíacas congénitas es rara, pero un número de pacientes desarrollaron anemias hemolíticas posterior a la reparación cardíaca de tales lesiones. Sayes y colaboradores describen un paciente quien desarrollo hemólisis intravascular severa, seguida de un cierre del parche de Teflón de un canal parcial atrioventricular (12).

En el año de 1973 Henderson realizó un estudio del reemplazo valvular con la válvula Beall con disco de Teflón en 59 pacientes, lo cual confirmó que la incidencia de la significancia clínica a la destrucción de los glóbulos rojos es alta. La válvula prótesica ideal no ha sido designada. Ninguna válvula es libre de las complicaciones de tromboembolismo, falla estructural, infección y destrucción Sanguínea. El tiempo designado de la válvula Beall ha disminuido la incidencia de tromboembolismo, su uso esta

asociado con la alta incidencia de la temprana y tardía hemólisis posoperatoria (13).

Roeser concluyó en 1978 que las válvulas heterógrafas no tienen materiales ajenos en la circulación y esto no fue asociado con la anemia hemolítica. Las anemias hemolíticas pueden ocurrir como una consecuencia del reemplazo valvular heterógrafo de porcino, aunque esto es inusual (14).

Por razones desconocidas, el grado de hemólisis varía considerablemente entre pacientes con el mismo tipo de válvula. Dale J. Myher realizó un estudio durante este mismo año y llegó a la siguiente conclusión: " La anemia hemolítica represento un problema solo en algunos pacientes con la válvula Starr-Edwards tipo 2300. La grieta valvular se asocia con una hemólisis más fuerte en algunos pacientes, puede ser sospechosa siempre que la proporción de la destrucción de los glóbulos rojos se incremente. Una hemólisis intravascular no afecta seriamente la función renal (15).

Falk R.H. et al., encontraron que la prótesis de Starr-Edwards en la posición aórtica causa gran hemólisis, al igual que la válvula en posición mitral. Las prótesis de Björk-Shiley con su modelo flujo central y una turbulencia pequeña, tuvo ventajas hemodinámicas sobre las prótesis valvulares de balón. La hemólisis intravascular es reducida

y por lo tanto presenta considerables ventajas sobre la prótesis de Starr-Edwards; éste estudio se realizó en el año de 1979 (16).

Gupta Satyendra C. et al., en 1980 informa un caso de anemia hemolítica seguida por una valvuloplastia mitral por ruptura de cuerdas tendinosas; y postularon que la hemólisis intravascular es el resultado de un movimiento en forma de azote causado por las terminaciones sueltas de la ruptura de las cuerdas tendinosas y la disrupción de la sutura del ataque al aparato de la válvula mitral. (17).

Al inicio de 1980s la disminución de la durabilidad de las bioprótesis llevo a ser un hecho, y las cirugías cardiacas cambiaron su disposición en la preocupación de su durabilidad al contrario de los eventos concurrentes a la Trombogenicidad posterior. Una razón fue que la segunda generación de válvulas mecánicas ofrecieron nuevas características dirigidas a disminuir la proporción de Trombogenicidad sin perdida de su durabilidad (11). Mok Pamela y colaboradores describieron el desarrollo de una anemia hemolítica severa seguida de una valvuloplastia con reparación mitral poco usual. La hemólisis intravascular y la anemia hemolítica siguiendo un reemplazo de prótesis valvular a sido atribuido a un trauma mecánico de los glóbulos rojos a través de la estructura protésica o turbulencia marcada del flujo sanguíneo debido a la

bioprótesis valvular agrietada. Su paciente desarrolló anemia hemolítica con hemoglobinuria marcada porque la destrucción de los glóbulos rojos fue causada por la anuloplastia y la alta velocidad retrograda de la regurgitación mitral (18).

En el año de 1980 Warnes C. et. al., notifican dos casos los cuales presentaron anemia hemolítica mecánica severa desarrollada brevemente después de la operación por reparación de regurgitación mitral no-reumática. Clínicamente la hemólisis cesó después del reemplazo de la válvula por una estructura Xenográfica. La hemólisis subclínica o la anemia hemolítica moderada puede ocurrir con lesiones valvulares, hasta aquí la anemia hemolítica ha sido observada sólo cuando la turbulencia del flujo sanguíneo es asociada con la presencia de una válvula protésica. En estos casos las suturas de poliéster o teflón tuvieron materiales extraños, esto sugiere que se puede incrementar el efecto daño de turbulencia en la circulación de los glóbulos rojos (19).

Durante este mismo año Magilligan realizó un estudio hematológico de pacientes que recibían un implante de válvula de porcino xenográfica en la posición aórtica o mitral. Y notifica el estado hemolítico después de los 12 meses de inserción de la válvula; una permanencia severa sugiere un mecanismo de interacción de las células rojas con

el cierre de Dacrón. La mayor causa de probabilidad de la hemólisis fue el gradiente a través de la xenografía aórtica. El gradiente de presión transvalvular alta causa la hemólisis en las válvulas protésicas. El paciente presento una hemólisis subclínica, evidenciado por las haptoglobinas y niveles de LDH consistente con las prótesis mitral y aórtica Björk-Shiley. La anemia hemolítica severa más certera fue relatada a la xenografía puntual en el origen aórtico el cual resulto una obstrucción del orificio secundario. Esto puede ser una contraindicación a la inserción de la válvula Xenográfica (8).

Sin embargo previas investigaciones en adultos han fallado al revelar la hemólisis con válvulas de porcino xenográfico en la posición mitral. Wessner Kenneth y colaboradores estudiaron en el año de 1981 la hemólisis intravascular asociada con la calcificación de la válvula; el desarrollo de la hemólisis en sus pacientes con valvulas porcinas en esa posición puede ser relatada con un desarrollo rápido de cambios patológicos severos que ocurren en niños con el reemplazo de la válvula de porcino.

La hemólisis puede ser hasta ahora un trauma secundario de células rojas causadas por la turbulencia asociada con una calcificación.

La ausencia de la hemólisis en adultos con el reemplazo de la válvula porcina puede ser debido a la proporción lenta de calcificación, o desarrollo de obstrucción o ambos.

Todos los pacientes presentaron una disfunción severa de la válvula, las pruebas de rutina y tamizaje para la hemólisis por evaluación eritrocitaria, DHL y niveles de haptoglobinas, que prevee una advertencia temprana de la disfunción de la válvula de porcino (20).

Goldberger Ary L. et al., (1982) informa que la hemólisis sólo se desarrollo en sus pacientes después de la reparación del defecto valvular y fue probablemente debido a la introducción de la sutura a material en el orificio paravalvular, así como los cambios de la geometría del orificio (21).

Sezai Y. et. al. realizaron un estudio de las características Hemodinámicas y Hemolíticas de las válvulas protésicas de St. Jude Medical en 86 casos, la incidencia de complicaciones tromboembolíticas fue de cero. Los resultados del grupo de las válvulas mecánicas de St. Jude Medical y el grupo de comisurotomía mitral abierta fueron equivalentes. En comparación con las válvulas protésicas cardiacas de tipo balón y bioprótesis las válvulas St. Jude Medical tiene una característica hemodinámica excelente. De acuerdo a la hemólisis St. Jude Medical estuvo por debajo solamente de la

válvula de Carpenter-Edwards, sin embargo el grado de hemólisis fue por lo tanto bajo (9).

La anemia hemolítica es una complicación relativamente común después del reemplazo de válvulas cardíacas con prótesis mecánicas, especialmente las variedades de la cubierta cerrada de esfera enjaulada. La falta de este fenómeno ha sido informado como una desventaja a la bioprótesis de porcino. Sin embargo Schaer David H. y colaboradores presentaron un caso en 1987 de anemia hemolítica significativa y regurgitación mitral debido a la "rasgadura" de la bioprótesis de porcino, 7 años después de su implante en la posición mitral. El trauma de los eritrocitos se atribuye al flujo turbulento con fuerzas elevadas a través de exponer las fibras de colágeno en las rasgaduras. Y concluyen que la rasgadura cuspal de porcino con regurgitación significativa de disfunción de prótesis valvular puede causar una anemia hemolítica (22).

Cheng Tsung O. en 1989 determina que la hemólisis depende de la prótesis mecánica usada, esto es: Más frecuente con prótesis valvular de bola, intermedio con discos tilding y comunmente menor con valvulas de tejido o biológicas. Entre pacientes con válvulas de esfera y disrupción de la cubierta cerrada, la válvula de anillo y estratos tienen un mejor factor de hemólisis, otros factores que contribuyen a esto son el material sintético de la válvula, trauma directa

a las células rojas y fuerzas de flujo creadas por los gradientes, flujo elevado y turbulencia como puede existir con grietas paravalvulares perforación o desgarre de la válvula bioprotésica. El reemplazo de la válvula protésica defectuosa puede ser necesaria si la anemia hemolítica es significativa (23).

En 1990 Vallejo publica sus experiencias en sustituciones polivalvulares con la prótesis mecánica de Medtronic-Hall (M-H) y concluye que las válvulas protésicas de disco han supuesto un gran avance en la terapéutica sustitutiva valvular. Aunque no son perfectas, proporcionan unos resultados satisfactorios y entre ellas la M-H ha demostrado ser una prótesis de confianza, no se ha producido ningún tipo de fallos estructurales de la prótesis. Su robustez y la gran amplitud del movimiento del disco proporcionan un buen mejoramiento hemodinámico al mismo tiempo que una tasa de tromboembolismo de las más bajas descritas en la literatura. La hemólisis se ha presentado con poca frecuencia y es perfectamente aceptable. Por todo ello la considera una prótesis de elección (24).

Lung Ole estudió la hemólisis crónica tardía después del reemplazo valvular por estenosis aórtica, e informó que la hemólisis intravascular inducida por la prótesis valvular aórtica es generalmente atribuido a las características del flujo turbulento inherente en la designación de las

prótesis. El aplastamiento mecánico directo de los eritrocitos por ambas prótesis de bola y de disco.

La anemia hemolítica representa un problema clínico, sin embargo se asocia usualmente con la rasgadura paravalvular.

El grado de hemólisis asociado con la prótesis valvular aórtica ha sido graficada sólo en estudios tratados en pocos meses a pocos años después del implante.

La hemólisis intravascular prevalece en todos los pacientes de este estudio, tuvo una significancia clínica limitada sólo en 4 pacientes que presentaron anemia y sólo 3 presentaron bilirrubinas elevadas (25).

En el año de 1991 Bloom Richard J., concluyó "El síndrome hemolítico puede ser asociado con un anillo de cubierta cerrada. La hemólisis cardíaca es una complicación posoperatoria inusual de operaciones valvulares, sin embargo esas operaciones de reparación valvular son avisadas a soportar el entendimiento de anillo de anuloplastia con estos problemas hematológicos" (26).

Wilson John H. et al., informó de dos casos de hemólisis intravascular severa después de la reparación de la válvula mitral usando anuloplastia de anillo Duran en el año de 1990. En ambos pacientes la regurgitación mitral se presentó, la hemólisis fue bastante severa que garantizaba

una segunda operación para que cesara la hemólisis inmediatamente después de la segunda operación. La hemólisis intravascular se presenta en una variedad de posoperaciones: Después de la colocación de las prótesis por reparación de defectos congénitos, con varias válvulas mecánicas y con rasgaduras paraprotésicas. En cuatro pacientes que hemólizaron, hubo asociación con la reparación de la válvula mitral.

Dos pacientes demostraron una hemólisis intravascular que puede ocurrir en asociación con anillos de cubierta cerrada. Y concluyen que " Siempre que una regurgitación de velocidad suficiente de prótesis mecánicas se presente la hemólisis puede ocurrir" (27).

En el año de 1991 Saad R. M. et al., realizaron un estudio de Anemia Hemolítica Progresiva debido a una dilatación reconocida de una prótesis valvular mitral, y notifican a un paciente, quien erróneamente diagnosticaron con prótesis de Bjork-Shiley hasta 1989 (17 años de posoperación) cuando el paciente presentó una anemia hemolítica severa. Tuvo múltiples marcadores severos respecto al disco empleado. Incluyendo marcadores que se elevan como LDH y excreción de hierro urinario (28).

Durante éste año López Valle realiza un estudio anatomopatológico de 1139 casos donde asegura que la

sobrevida de los pacientes receptores de implantes del Instituto Nacional de Cardiología está en 82.2% y la tasa de disfunción de las prótesis es de 3.38% para este período de cuatro años y medio (29). Dentro de ésta misma Institución Castilla estudia la evolución postoperatoria en el recambio valvular protésico. Concluyendo que las causas más frecuentes de disfunción fueron: ruptura de las valvas de la prótesis, estenosis con calcificación de la prótesis y fuga paravalvular. Es importante la detección precoz de la disfunción protésica y deben valorarse procedimientos especiales de abordaje quirúrgico, buscando aproximar la morbi-mortalidad de éste procedimiento a la de un primer cambio valvular (30).

Smith Roy E. et. al., investigaron en esté mismo año la rasgadura paravalvular en una presentación clínica normal de una válvula mitral St. Jude con riesgo vital de anemia hemolítica microangiopática. Previas investigaciones habían encontrado que la severidad de está anemia puede ser relacionada con el tipo de válvula protésica, la severidad del mal funcionamiento valvular o rasgadura (agrietamiento) paravalvular y turbulencia causada por el gradiente transvalvular. La válvula St. Jude Medical es comunmente usada en la posición mitral y es raramente asociado con la anemia hemolítica significativa fuera del mal funcionamiento valvular (31).

F. Efectos de Perfusión en sangre:

La destrucción de los glóbulos rojos ocurre durante la perfusión (32). La hemoglobina es liberada al plasma y transportada con una proteína unida, un estado libre en el plasma tiene la capacidad de unirse si es excedida. La hemoglobina libre es removida en una proporción fija por el sistema reticuloendotelial, por el riñón y por la transformación a Metahemoglobina en la sangre.

Cuando todas las funciones orgánicas tienen que estar protegidas por el uso de rendimiento de perfusión alta alta, la hemoglobina libre es liberada con pocas horas después del fin del procedimiento.

El estudio de los posibles factores responsables que revelan una hemólisis son:

- a) Más de la destrucción de los eritrocitos durante la circulación extracórporea es causada por la bomba y pasajes estrechos
- b) La extensión de la destrucción varía con el material del cual el tubo y las partes de la bomba de oxígeno están hechos.

En general las partes lisas disminuyen la hemólisis.

- c) Debido al tamaño del tubo, este tiene una velocidad de flujo crítico, si se excede produce hemólisis.
- d) Succión excesiva.
- e) Presión elevada sostenida aplicada a la sangre. Una presión positiva intermitente de más en el procedimiento es más probable la hemólisis.
- f) Burbujas del oxigenador con flujo de gas a través de orificios diminutos, la fuerza de la formación de burbujas puede ser responsable de la hemólisis.
- g) La oclusión de la bomba produce hemólisis, la cual se inclina a causar daño sanguíneo por turbulencia.
- h) El calentamiento sanguíneo puede causar hemólisis severa.
- i) El almacenaje de heparina en la sangre incrementa la destrucción eritrocitaria.
- j) La dilución de la sangre con soluciones fisiológicas disminuye la desventaja de destrucción.

Bajo condiciones de flujo continuo, flujo de gas y temperatura, en experimentos "in vitro" indican el incremento de la hemólisis lineal con el tiempo por las

primeras horas, entonces en una proporción rápida progresiva las células sanguíneas pierden la viabilidad. El recuento de las células rojas y el hematocrito permanece sin cambio.

G. COMPLICACIONES DE LAS VALVULAS CARDIACAS ARTIFICIALES:

Una serie de estudios reportan que cerca de la mitad de los pacientes sobreviven al reemplazo valvular, mueren o tienen serias complicaciones varios años después del implante.

Las principales complicaciones que puede sufrir el paciente se encuentra: Endocarditis infecciosa, tromboembolismo, disfunción de prótesis y hemólisis.

El incremento intravascular hemolítico ocurre en la mayoría de los pacientes con prótesis valvular mecánica y ha sido reportado comúnmente con el uso de válvulas protésicas. La primera causa es el trauma mecánico de los glóbulos rojos a partir de la turbulencia del flujo sanguíneo a través de las prótesis. En más pacientes se acelero la eritropoyesis compensada por el incremento de la destrucción de los glóbulos rojos, el cual en el laboratorio la evidencia de la hemólisis es la única manifestación . Los factores causan una turbulencia excesiva, particularmente una disfunción valvular, se puede exceder su capacidad por compensación y causar una anemia hemolítica. La incidencia de la anemia

presentó una variación del 5% al 15% para diferentes prótesis.

La disfunción puede ser sospechosa en pacientes con una anemia hemolítica aguda. La causa más común incluye una regurgitación valvular para-prótesica, un alto gradiente de presión transvalvar, obstrucción valvular debido a una rasgadura en el cierre protesico.

La anemia hemolítica se puede agravar por deficiencia de hierro, con un incremento de la fragilidad de glóbulos rojos pobres en hierro, y por anemia como resultado de una disminución de la viscosidad, incremento del rendimiento cardíaco e incremento de la turbulencia del flujo sanguíneo. La determinación de la Deshidrogenasa Láctica Sérica (DHL) provee una prueba económica y sensible para tamizaje y seguimiento de la hemólisis intravasascular. Los niveles de DHL menores de 500 U/ml indican una hemólisis pequeña, los niveles de 500 a 1000 U/ml ocurren con una hemólisis moderada y los niveles altos mayores de 1000 U/ml sugieren una hemólisis severa.

Serios estudios muestran un incremento progresivo de DHL los cuales sugieren una disfunción protesicã (33).

H. ANEMIAS HEMOLITICAS:

Los eritrocitos normalmente tienen una "vida" que dura aproximadamente 120 días (34). Cuando el eritrocito es desintegrado, el hierro de la hemoglobina se almacena en las células del sistema reticuloendotelial. En estas mismas células el hem es convertido en bilirrubina no conjugada que luego es transportada con el plasma hasta el hígado, donde se conjuga y es eliminada por el sistema biliar; en el intestino, la bilirrubina se convierte en urobilinógeno fecal.

Las anemias hemolíticas se caracterizan por una vida abreviada de los glóbulos destruidos suele acompañarse de agrandamiento del bazo, aumento de la bilirrubina no conjugada en el plasma sanguíneo, y aumento de la excreción fecal de urobilinógeno.

En frotis teñidos de sangre periférica suele haber manifestaciones netas de la anomalía congénita o adquirida de la estructura de los eritrocitos, en forma de esferocitosis, poiquilocitosis, anisocitosis o punteado basófilo.

En la mayor parte de los pacientes con anemia hemolítica la destrucción de los glóbulos rojos es extravascular en el sistema reticuloendotelial. En el número limitado de los

trastornos hemolíticos los glóbulos rojos se destruyen dentro de los vasos originando hemoglobinuria. La hemoglobina liberada hacia el plasma se une a una globulina alfa₂, haptoglobina, capaz de fijar dos moléculas de hemoglobina cuando sea superado el umbral de fijación de la haptoglobina, el orden de 90 a 130 mg de hemoglobina por 100 ml de plasma, la hemoglobina aparece en la orina.

Otras indicaciones de hemólisis intravascular son los aumentos de la hemoglobina, metahemoglobina y deshidrogenasa láctica en el plasma, con disminución o desaparición de haptoglobina y hemosiderinuria.

Clasificación de las anemias hemolíticas:

Cualquier proceso que disminuya la duración de la vida de los eritrocitos tiene por consecuencia una hemólisis aumentada; si la eritropoyesis no puede compensar el aumento de la hemólisis aparece anemia. Se ha demostrado una vida abreviada del eritrocito en casi todos los tipos de anemia que acompañan a estados patológicos. En muchos casos el acortamiento de la vida es ligero no mayor de lo que puede compensar la médula ósea si funciona normalmente.

Suele reservarse el término "anemia hemolítica" para aquellos pacientes que presentan un grado intenso de hemólisis excesiva, asociada con anemia. El término

"enfermedad hemolítica" es más amplio e incluye pacientes sin anemia que tienen un exceso apreciable de hemólisis.

Diversas anomalías afectan el glóbulo rojo y provocan anemia hemolítica. Resulta adecuado clasificar los trastornos hemolíticos según que sean hereditarios o adquiridos (CUADRO I).

CUADRO I. CLASIFICACION DE LAS ENFERMEDADES HEMOLITICAS**I. Transtornos hemolíticos hereditarios****A. Defectos de la membrana del glóbulo rojo**

1. Esferocitosis hereditaria
2. Eliptocitosis hereditaria
3. Estomatocitosis
4. Aumento selectivo de la lecitina de la membrana

**B. Deficiencia del sistema enzimático fosfato de pentosa
-glutación**

1. Deshidrogenasa de 6-fosfato de glucosa
2. Otros: deshidrogenasa de 6-fosfogluconato, reductasa de glutación, sintetasa de glutación.

C) Deficiencia de enzimas glucolíticas

1. Cinasa de piruvato
2. Otras: Difosfogliceromutasa, isomerasa de fosfato de triosa, isomerasa de fosfato de glucosa, conasa de fosfoglicerato, fosfofructocinas, hexocinasa, deshidrogenasa de 3-fosfato de gliceraldehído, ATPasa.

D) Deficiencias enzimáticas diversas

1. ATPasa
2. Cinasa de adenilato
3. Perafosfocinasa de fosfato de ribosa

Continuación del CUADRO I.

E) Hemoglobinopatías

1. Anemia de glóbulos falciformes
2. Enfermedad de hemoglobina C
3. Talasemia
4. Combinaciones: Enfermedad de drepanocitosis y hemoglobina C, enfermedad de drepanocitosis-talasemia, enfermedad de drepanocitosis-hemoglobina D, y otras.
5. Hemoglobinas inestables: de Zurich, Colonia, Ginebra, Sydney, Hammersmith, Gun-Hill y otras.

II. Trastornos hemolíticos adquiridos

A) Mediados por anticuerpos

1. Isoanticuerpos
 - a) Reacciones de transfusión
 - b) Eritroblastosis fetal
2. Anticuerpos inducidos por fármacos
 - a) Quinidina
 - b) Penicilina
 - c) Metildopa
3. Autoanticuerpos
 - a) Idiopáticos
 - b) Secundarios -procesos malignos, enfermedad de tejido conectivo, neumonía por micoplasmas.

B) Hemoglobinuria nocturna paroxística

C) Hemólisis mecánica

1. Hemoglobinuria de marcha
2. Anemia hemolítica cardíaca
3. Anemia hemolítica microangiopática

E) Químicas

F) Agentes físicos

G) Hiperesplenismo

H) Hipofosfatemia

I) Enfermedades del hígado

J) Enfermedades del riñón

Hemólisis Intravascular y Extravascular

Hacia el final del período de su vida, el eritrocito pierde su capacidad para mantener la forma del disco bicóncavo. La membrana celular senil es menos capaz de mantener el gradiente de sodio y potasio. Por último, la célula es fagocitada por los histiocitos del sistema reticuloendotelial, principalmente en el bazo. En el histiocito se destruye la célula, siendo separada la porción globina de la porción heme. Se rompe el anillo de heme, se recicla el hierro y los heme remanentes se liberan hacia el plasma en forma de bilirrubina. La bilirrubina adherida a la albúmina como un complejo simple es transportada hacia el hígado donde es conjugada hacia glucóronido. A este proceso se le llama **hemólisis extravascular** y es la vía normal de eliminación del eritrocito.

En algunos casos como en las reacciones transfusionales hemolíticas se puede presentar hemólisis excesiva dentro del compartimiento vascular. En estos casos se libera hemoglobina eritrocítica hacia el espacio vascular en lugar de cruzar las células reticuloendoteliales. Se puede unir hasta 150 mg/dl de hemoglobina a la haptoglobina, un enlace de la proteína a la hemoglobina que se presenta normalmente. El exceso de este nivel de hemoglobina se filtra a través de los tubulos renales. Entonces se forma la hemosiderina en las células tubulares y se elimina por la orina. Se encuentra hemosiderina urinaria solamente en la **hemólisis**

intravascular y es una prueba diferencial importante en lo estudio de los procesos hemolíticos (35).

FUNDAMENTO DEL TEMA

Todas las prótesis valvulares están constituidas con materiales inertes (silástico, teflón, stellite, titanio entre otros), los cuales tienen una compatibilidad hística aceptable, sin embargo no están libres de causar trombogenicidad y hemólisis. Cuando se implanta una prótesis valvular, una considerable superficie extraña se pone en contacto con la corriente sanguínea.

Numerosos estudios se han llevado a cabo referentes al daño producido sobre los hematíes de los pacientes, se ha detectado un ligero grado de hemólisis con un funcionamiento normal de la válvula. Suele ser más pronunciado tras una sustitución aórtica que después de un reemplazo valvular mitral. Conlleva a un descenso de la Haptoglobina sérica, incremento de la Deshidrogenasa Láctica, un aumento en la producción de monóxido de carbono, una ligera hemoglobinemia y una excreción urinaria de hierro elevada. La mayoría de los estudios han manifestado que la destrucción de los hematíes es elevada con una disfunción de la prótesis valvular. La anemia hemolítica puede tratarse con la administración de hierro y ácido fólico; sin embargo se han notificado hemólisis pronunciadas con las válvulas de Starr-Edwards recubiertas de tela así como las descubiertas.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los pacientes con prótesis cardiacas cursan con hemólisis mecánica en grado variable y clínicamente pueden conducir a una Anemia Hemolítica adquirida. Es por ellos que como parte del Diagnóstico y del Tratamiento de de los pacientes se plantea la necesidad de evaluar a través de diferentes pruebas de laboratorio el grado de hemólisis.

OBJETIVOS**A. OBJETIVO GENERAL:**

En los pacientes con valvuloplastia cardíaca determinar su estado hematológico en sangre periférica mediante diferentes pruebas del laboratorio.

B. OBJETIVOS PARTICULARES:

Determinar Biometría hemática completa, con énfasis principal en el frotis sanguíneo en busca de alteraciones morfológicas que indiquen o sugieran hemólisis (Esquistocitos, eritrocitos fragmentados, crenocitos, eliptocitos entre otras estructura morfológicas).

Determinar el índice de Reticulocitos.

Determinar los niveles de Hemoglobina libre, Metahemoglobina y Pigmento de Metahemoglobina.

Determinar Bilirrubina Directa, Indirecta y Total, Aspartato Amino Transferasa (ASAT), Alanin Amino Transferasa (ALAT) y Deshidrogenasa Láctica como pruebas complementarias.

HIPOTESIS

Los pacientes con Valvuloplastia cursan con hemólisis secundaria, la cual se manifiesta en los primeros diez días después del implante. La severidad de la anemia hemolítica estará condicionada por el tipo y material de la válvula cardíaca implantada, así como por el tiempo de implante.

MATERIAL**A. MATERIAL BIOLÓGICO:**

1. Sangre venosa con anticoagulante E.D.T.A. 5%.
2. Sangre venosa sin anticoagulante.

B. MATERIAL DIVERSO:

1. Algodón
2. Gradilla para tubos de ensaye
3. Jeringas estériles de 10 ml.
4. Ligadura
5. Lápiz graso
6. Maskin-Tape
7. Marcador
8. Pipetas automáticas Merck Transferpette: 20 ul, 50 ul, 100 ul y 1000 ul.
9. Tijeras

C. MATERIAL DE VIDRIO:

- | | |
|--------------------------------|------------------------|
| 1. Celdas espectrofotométricas | |
| 2. Pipetas graduadas | 0.1, 1.0, 5.0 y 10 ml. |
| 3. Portaobjetos | |
| 4. Matraz Aforado | 250 ml. |
| 5. Matraz Aforado | 500 ml. |
| 6. Tubos de ensaye | 13X75 |
| 7. Tubos de ensaye | 18X150 |
| 8. Vasos de precipitados | 100 ml. |

9. Vasos de precipitados 500 ml.

D. EQUIPO:

1. Agitador de Pipetas de Thoma Yankee Pipetter Sharker
Clay Adwams.
2. Balanza Analítica Bio-Tek.
3. Balanza Granataria Bio-Tek.
4. Centrifuga Clínica Internacional Centrifuge Mod. CS.
5. Celldyn 3000 (Anexo).
6. Espectrofotómetro Colleman Jr. IIA.
7. Express 550 (Anexo).
8. Microscópio Optico Carl Zeiss.

E. REACTIVOS:

1. Acido Acético Glacial (C_2H_4O), Grado Analítico, Merck.
2. Acido Nítrico (HNO_3), Reactivo Analítico, Baker.
3. Acido Sulfúrico (H_2SO_4), Reactivo Analítico, Monterrey
4. Aceite de Inmersión, Merck.
5. Alcohol Etilico (CH_3CH_2OH), Grado Analítico, Merck.
6. Bencidina ($C_{12}H_{12}N_2$), Grado Analítico, Merck.

6. **Bencidina** ($C_{12}H_{12}N_2$), Grado Analítico, Merck.
7. **Cianuro de Sodio** ($NaOCN$), Reactivo Analítico, Baker.
8. **Colorante de Wright** Sigma de México S.A.
9. **E.D.T.A.** ($C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8$), Grado Analítico, Merck.
10. **Ferrocianuro de Potasio** [$K_4Fe(CN)_6$], Reactivo Analítico, Baker.
11. **Fosfato de Potasio Monobásico** (KH_2PO_4), Reactivo Analítico, Sigma de México S.A.
12. **Fosfato de Sodio Dibásico anhídrido** (Na_2HPO_4) Sigama de México S.A.
13. **Glicerina** Grado Reactivo, Merck.
14. **Hidróxido de Sodio** ($NaOH$), Grado Analítico, Merck.
15. **Metanol Absoluto** (CH_3OH), Grado Analítico, Merk.
16. **Peróxido de Hidrógeno** (H_2O_2) 30%, Grado Analítico, Promex S.A. de C.V.
17. **Tinción Azul de Metileno** Sigma de México S.A.

18. Rojo de Cresol Sigma de México S.A.

19. Anaranjado de Metilo Sigma de Méxuco S.A.

F. SOLUCIONES:

1. Tampón de Fosfato pH 6.8	0.067 M.
Solución A:	
KH ₂ PO ₄ anhidro	9.110 g.
H ₂ O destilada c.s.p.	1 000 ml.
Solución B:	
Na ₂ HPO ₄ anhidro	9.700 g.
H ₂ O destilada c.s.p.	1 000 ml.
2. Tampón de Trabajo pH 6.8	0.067 M.
Solución A	50 ml.
Solución B	50 ml.
H ₂ O destilada c.s.p.	1 000 ml.
3. Colorante de Wrigth	
Wrigth en polvo	3 g.
Glicerina	30 ml.
Metanol Absoluto c.s.p.	1 000 ml.
4. Tinción Azul de Metileno	
Azul de Metileno nuevo	0.530 g.

- | | |
|----------------------------------|---------|
| Oxalato de Potasio Monohidratado | 1.600 g |
| H2O destilada | 100 ml. |
5. Bencidina Solución 1%
- | | |
|--------------------------|---------|
| Bencidina pura | 1 g. |
| Acido Acético 90% c.s.p. | 100 ml. |
6. Acido Acético 10% (v/v)
- | | |
|-----------------------|---------|
| Acido Acético Glacial | 10 ml. |
| H2O destilada c.s.p. | 100 ml. |
7. Peróxido de Hidrógeno 1%
- | | |
|----------------------|--------|
| H2O2 30% | 1 ml. |
| H2O destilada c.s.p. | 30 ml. |
8. Solución Amortiguadora de fosfato M/15 (0.07M)
- Se preparan las soluciones de K_2HPO_4 y KH_2PO_4 M/15.
- 0.64 partes de KH_2PO_4 se mezclan con 0.36 partes de K_2HPO_4 para proporcionar un amortiguador con pH 6.6.
9. Solución Amortiguadora de fosfato M/16 (0.017M)
- Diluir 250 ml de Tampón de fosfato M/15 hasta 1 litro con agua destilada.
10. Ferrocianuro potásico al 20 %
- Disolver 2 g de ferrocianuro potásico en 10 ml de H2O destilada. Almacenarla en un frasco de cristal oscuro

a temperatura ambiente.

11. Solución de Cianuro sódico

Disolver 1 g de cianuro sódico en 10 ml de H₂O está disolución puede ser guardada a temperatura ambiente.

Etiquetar con la inscripción «veneno».

12. Solución Acido Acético al 12 %

Diluir 12 ml de ácido acético glacial en H₂O hasta aforar a 100 ml.

13. Cianuro Neutralizado

Pipetear 4 gotas de disolución de cianuro sódico en un tubo de ensayo pequeño. En un sitio ventilado añadir 4 gotas de la disolución de ácido acético 12%. Tapar con parafilm, guardar a temperatura ambiente, debe ser empleada dentro de la primera hora de su formación.

14. Alcohol Etilico 70%

Alcohol etilico	70 ml
H ₂ O destilada c.s.p.	100 ml

15. Determinación ASAT (Equipo comercial Merck)

Solución Buffer-Sustrato (100 mmol/I buffer fosfato pH 7.4; 100 mmol/I L- aspartato; 2 mmol/I 2 oxoglutarato)

Disolver el contenido de la botella 1 en 30 ml de agua

destilada. Es estable por una semana a temperatura 2 a 8 C o de tres meses si se mezcla con unas gotas de cloroformo.

Reactivo de Color (1.5 mmol/I 2,4 dinitrofenilhidrazina)

El contenido de la botella 2 está lista para usarla

Solución hidróxido de sodio (0.4 mol/I NaOH)

Disolver el contenido de la botella 3 en 1000 ml de H₂O destilada en un contenedor de cristal o polietileno. Es estable 15-25 C.

Solución Estándar (2 mmol/I piruvato de sodio)

El contenido de la botella 4 esta listo para usar.

16. Determinación ALAT (Equipo comercial Merck)

Solución Buffer-Sustrato (100 mmol/I buffer fosfato pH 7.4; 100 mmol/ I DL-alanina; 2 mmol/I 2 oxoglutarato).

Disolver el contenido de la botella 1 en 30 ml de agua destilada. Es estable por una semana a temperatura 2 a 8 C o de tres meses si se mezcla con unas gotas de cloroformo.

Reactivo de Color (1.5 mmol/I 2,4 dinitrofenilhidrazina)

El contenido de la botella 2 está lista para usarla

Solución hidróxido de sodio (0.4 mol/I NaOH)

Disolver el contenido de la botella 3 en 1000 ml de

H₂O destilada en un contenedor de cristal o polietileno. Es estable 15-25 C.

Solución Estándar (2 mmol/l piruvato de sodio)

El contenido de la botella 4 esta listo para usar.

17. Determinación de Deshidrogenasa Láctica (DHL), [Equipo comercial Merck].

Solución Buffer-Sustrato (solvente) 40 ml

NADH

Pipetear 3 ml de la solución buffer-sustrato, botella 1, al contenido de la botella 2.

Es estable por 8 hrs cuando se almacena a 15-25 C.

18. Determinación de Bilirrubinas (Equipo comercial Merck)

Solución ácido sulfanilico (29 mmol/l C₆H₇NO₃S; 170 mmol /HCl)

Solución Nitrito de Sodio (29 mmol/l NaNO₂)

Acelerador (130 mmol/l cafeína 156 mmol/l benzoato de sodio; 460 mmol/l acetato de sodio).

Solución Fehling II (930 mmol/l Tartrato sódico de potasio; 1.9 mmol/l Solución NaOH)

Todos los reactivos son estables cuando son almacenados 15-25 C.

Solución Diazo: Mezclar la solución de nitrito de sodio 2 y solución de ácido sulfanilico 1 en un volumen proporcional de 1+4.

Es estable por 2 hrs cuando es almacenada 15-25 C.

Todos los reactivos están listos para usarse.

19. Reactivos empleados en el Celldyn 3000

<u>Diluyente isotónico</u>	No. Catalógo 9900231
<u>Lizante de Hemoglobina</u>	No. Catalógo 9900410
<u>Sheath Acondicionador para glóbulos blancos</u>	No. Catalógo 9900311
<u>Sangre Control</u>	No. Catalógo 9900111

METODO**A. CARACTERISTICAS DE LOS PACIENTES****1. CRITERIOS DE INCLUSION**

Pacientes que sean sometidos a cirugía cardíaca por implante valvular.

2. CRITERIOS DE EXCLUSION

Pacientes Diabéticos

Pacientes Hipercoleterolémicos

Pacientes que cursan un estado Anémico

Pacientes con anemias Hemolíticas Autoinmunes

Pacientes con Sangrados o Hepatopatías

3. GRUPO DE TRABAJO

GRUPO I . Pacientes sanos que no son candidatos a cirugía cardiovascular, que acudan a consulta externa y al Laboratorio Clínico del Hospital de Cardiología "LUIS MENDEZ" del Centro Médico Nacional siglo XXI.

GRUPO II . Pacientes que anteriormente hayan recibido un implante valvular.

GRUPO III. Pacientes con cirugía de Corazón, que fueron sometidos a un implante valvular.

Los pacientes fueron captados a través de los servicios mencionados y se revisó el expediente clínico para considerar los siguientes datos:

- a) Nombre del paciente
- b) Edad del paciente
- c) Sexo del paciente
- d) Número de afiliación
- e) Antecedentes personales patológicos de importancia clínica.
- f) Diagnóstico clínico
- g) Tiempo de evolución
- h) Indicaciones del implante valvular .

Se realizó como pruebas preoperatorias de rutina la determinación del antígeno VIH, Hepatitis y Aloanticuerpos.

4. EVALUACION DEL FUNCIONAMIENTO DEL ESPECTROFOTOMETRO

Linealidad: Método Anaranjado de Metilo (Anexo).

Chequeo de la linealidad: Método Rojo de cresol (Puntos Isosbéticos) [Anexo].

B. OBTENCION DE LA MUESTRA SANGUINEA Y SEPARACION DEL SUERO:

Se empleó material para trabajar nuevo, limpio (libre de polvo, jabón u otras partículas, se trató con ácido nítrico concentrado con un enjuague exhaustivo al material que lo requería). Las muestras fueron analizadas durante el mismo día de la extracción, empleando sueros control de referencia como Control de Calidad.

Se realizó una extracción de 8 ml., de sangre venosa empleando una jeringa estéril o por goteo. Tres mililitros de la muestra sanguínea fueron depositados en un tubo de ensaye que contenía 0.02 ml de E.D.T.A. al 5%, el resto de la muestra fue depositada en otro tubo de ensaye sin anticoagulante. Esta última muestra recibió un tratamiento de doble centrifugación a 2500 r.p.m., durante 10 minutos, con el objetivo de separar completamente el suero del paquete celular. No se empleó aplicador u otro material de laboratorio para remover la muestra, ya que se hemolizaría y los resultados no serían confiables por lo que se optó por una contracción natural del coágulo.

Es importante indicar que la determinación de la Hemoglobina libre (Hb ↑) puede realizarse en plasma, sin embargo el empleo de un anticoagulante, el movimiento del tubo durante su homogenización produce un rompimiento de los eritrocitos y por lo tanto una liberación de la hemoglobina eritrocitaria, incrementándose los niveles de Hb; Es por ello que se decidió trabajar con suero.

La muestra sanguínea se trabajó bajo el siguiente Control de Calidad:

1. Realizar una extracción de la muestra sanguínea a través de la punción venosa o por goteo, en caso de emplear jeringa ésta debe estar seca y la muestra debe obtenerse por succión

suave para minimizar la ruptura de los glóbulos rojos. Emplear preferentemente agujas de calibre 20, debe entrar en la vena sin excesivo trauma.

2. El efecto de la hemólisis in vitro puede reducirse al mínimo permitiendo que se seque el alcohol que se aplica sobre la piel antes de practicar la venopunción. Esto es debido al contacto directo que puede tener el desinfectante con las células sanguíneas, sin dejar de pensar que esta a su vez es un factor que le produce más dolor al paciente.

3. La estasis venosa prolongada, hace la muestra inapropiada pues provoca hemoconcentración. El torniquete no debe estar demasiado apretado.

4. Depositar la muestra a través de las paredes del tubo lentamente para evitar el choque de la sangre contra el fondo del tubo y la formación de espuma.

5. Evitar:

Una larga permanencia de la sangre total en el contenedor (tubo).

La contaminación de la sangre con detergentes, agua, reactivos residuales en los tubos y cristalería.

Choque térmico (enfriamiento o calentamiento excesivo)

Centrifugación inadecuada (uso de freno)

Esto es debido a que todos estos son factores de hemóli-

sis.

6. Para la obtención del suero, no debe «contonearse» el coágulo, ni centrifugar la sangre hasta que se haya formado un coágulo firme. No emplear aplicador para su separación.
7. La muestra es centrifugada a 2500 r.p.m. durante 10 minutos, separar el suero y este es nuevamente sometido a centrifugación en las mismas condiciones. Esto se realiza con la finalidad de separar el suero de los glóbulos rojos completamente, para evitar que éstos intervengan en la determinación.
8. En la determinación de la MHB y PMHB (sangre total) realizar la prueba máximo 2 horas después de su extracción, debido a que estos niveles son alterados de una forma ascendente conforme se expone al oxígeno.
9. Emplear celdas con una capacidad de 20 ml. para facilitar la determinación espectrofotométrica de MHB y PMHB.

C. EVALUACION HEMOLITICA:

El análisis para evaluar la hemólisis de los pacientes del grupo III se realizó en tres etapas:

- I. Etapa Basal: Se realizarón las pruebas a las 24 horas antes del implante.
- II. Etapa de seguimiento a temprano plazo: Se realizaron las pruebas a las 24 horas después del implante.
- III. Etapa de seguimiento a mediano plazo: Las pruebas de hemólisis se realizaron al tercer, septimo y octavo días después del implante.

La evaluación hemolítica de los eritrocitos se baso en la determinación de las siguientes pruebas [Diagrama 1]:

Biometría Hemática: Hematocrito, Cuenta de eritrocitos, Hemoglobina, Morfología eritrocitaria (el objetivo de estos estudios era clasificar la anemia apartir de su morfología e identificar la naturaleza a causa de la hemólisis; el estudio morfológico de los eritrocitos se realizó en un extendido con tinción de Wright), Reticulocitos, Cuenta de Leucocitos y Cuenta diferencial.

Determinación de Aspartato Amino Tranferasa (ASAT) en suero.

Determinación de Alanin Amino Transferasa (ALAT) en suero.

Determinación de Deshidrogenasa Láctica en suero.

Determinación de Bilirrubina directa, indirecta y total en suero.

Determinació Hemoglobina libre (Hb \uparrow) en suero.

Determinación de la Metahemoglobina y Pigmento de Metahemoglobina en sangre.

1. HEMATOCRITO:

Método. Automatizado

Equipo. Celldyn 3000

La determinación del hematocrito se realiza para medir el volúmen que ocupan los glóbulos rojos en muestras de sangre capilar o venosa.

El resultado del hematocrito es calculado a partir del conteo de las células rojas y del valor del volúmen medio celular empleando la siguiente fórmula:

$$\text{HCT} = (\text{RBC} \times \text{MCV}) / 10$$

Cada resultado de HCT XX.X % es reportado como porcentaje del paquete de los glóbulos rojos.

2. CUENTA DE GLOBULOS ROJOS

Método. Automatizado

Equipo. Celldyn 3000

Se aspiran 0.5 ul de sangre total, es aislada en la sección central de la válvula y es administrado al diluyente RBC/PLT. La proporción de la dilución RBC/PLT es 1:12,500 es empleado para la medición del número y tamaño de las células rojas y plaquetas.

3. HEMOGLOBINA

Método. Automatizado

Equipo. Celldyn 3000

Se prepara una dilución, con una proporción 1:250 y se mezcla con un reactivo lítico. La hemoglobina libre apartir de la ruptura de los glóbulos rojos es convertido a un complejo de cianometahemoglobina, que es medido para su determinación a una absorvancia de 540 nm.

Cada HGB XX.Xg/dl es reportado directamente como gramos de hemoglobina por decilitro de sangre total.

4. MORFOLOGIA ERITROCITARIA

Método. Manual

Equipo. Microscopio Carl-Zeiss

El estudio morfológico de los eritrocitos se realizan en un extendido con tinción de Wright. Determinar la presencia de esferocitos, eliptocitos, eritrocitos fragmentados etc.

El objetivo de estos estudios es clasificar a las anemias hemolíticas apartir de la morfología e identificar la naturaleza o causa de la hemólisis.

5. RETICULOCITOS

Método. Manual

Equipo. Microscópio Carl-Zeiss

Cuando se tiñen con azul de metileno u otros colorantes vitales que penetran a la célula viva antes de la fijación,

se precipita el ácido ribonucleico y aparece como una red azul que da el nombre de reticulocitos a la célula.

En un tubo 12X75 mm, colocar 4 gotas de azul de metileno nuevo 1%, añadir 4 gotas de sangre anticoagulada homogenizada. Mezclar perfectamente y dejar reposar durante 15 minutos, mezclar bien la suspensión y preparar 2 extensiones. Observar al microscopio a 100X. Como base del cálculo, examinar 1000 eritrocitos, contar el número de reticulocitos que se encuentran en 1000 eritrocitos.

$$\% \text{Reticulocitos} = \frac{\text{No. de Reticulocitos encontrados}}{\text{No. total de eritrocitos examinados}} \times 100$$

6. CUENTA DE LEUCOCITOS

Método. Automatizado

Equipo. Celdyn 3000

La jeringa de glóbulos blancos (WBC) dispensa 32 ul de la sangre total con un diluyente leucoprotectivo dentro del baño de dilución de los glóbulos blancos (WBC). Estos reactivos tienen la propiedad de mantener las células blancas en su estado nativo. La proporción de dilución de los glóbulos blancos es de 1:51 y se emplea para la determinación del número de las células blancas (leucocitos) y para la clasificación diferencial de las 5 subpoblaciones de las células blancas.

7. CUENTA DIFERENCIAL

Método. Manual

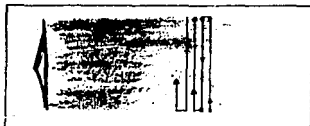
Equipo. Microscópio Carl-Zeiss

El recuento diferencial es un estudio cualitativo de los trombocitos y del número de leucocitos que pertenecen a cada tipo: Granulocitos, linfocitos y monocitos.

La tinción de Wright es la más utilizada, es un colorante policromático soluble en metanol que contiene un colorante ácido y otro básico, producen una diversidad de colores.

- Hacer un frotis de sangre periférica (fino), dejarlo secar a temperatura ambiente.
- Cubrir el frotis con el colorante de Wright durante 9 minutos.
- Agregar solución Tampón en igual volumen al del colorante. Mezclar bien y cuidadosamente por soplado hasta que aparezca una película metálica en la superficie de la lámina. Dejar durante 12 minutos.
- Lavar suficiente con agua, limpiar la lámina por el lado contrario al cual se practicó el frotis y dejar secar.
- Observar a 40X y 100X y efectuar el recuento de método cruzado [Fig. 5].

Figura 5. Método Cruzado para el conteo de Leucocitos.



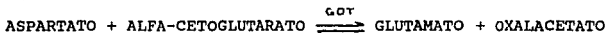
8. ASPARTATO AMINO TRANSFERASA (ASAT)

Método. Automatizado, Colorimétrico.

Equipo. Express 550

La producción del consumo del NADH es determinado fotométricamente y es directamente proporcional a la actividad de GOT (ASAT) en la muestra.

La Transaminasa glutámico-oxaloacética (GOT) cataliza la siguiente reacción:



El Oxalacetato formado reacciona en solución alcalina con 2,4 dinitrofenilhidrazina.

REACTIVOS	MUESTRA	PATRON
Sol. Buffer-Sustrato (1)	0.50 ml	0.50 ml
Incubar por 5 minutos a 37° C		
Suero (fresco, no hemolizado)	0.20 ml	--
Mezclar e incubar exactamente 30 minutos a 37° C		
Reactivo de Color (2)	0.50 ml	0.50 ml
Estándar	--	0.20 ml
Mezclar e incubar exactamente 20 minutos a Temp. Ambiente		
Sol. NaOH (3)	5.00 ml	5.00 ml
Mezclar y después de 5 a 30 minutos medir la absorvancia de la muestra a una lóngitud de onda 500-560 nm.		

Usando los valores de absorbancia de las muestras leer la actividad de la enzima U/L extrapolando en la curva de calibración.

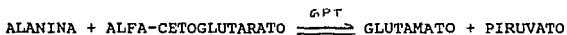
9. ALANIN AMINO TRANSFERASA (ALAT)

Método. Automatizado, colorimétrico

Equipo. Express 550

La proporción del consumo de NADH es determinado fotométricamente y es directamente proporcional al GPT a la actividad del ALAT en la muestra.

La Transaminasa-Glutámico-Pirúvica (GPT) cataliza la siguiente reacción:



El pirúvato formado reacciona en solución alcalina con 2,4 dinitrofenilhidrazina.

REACTIVO	MUESTRA	PATRON
Sol. Buffer-Substrato (1)	0.50 ml	0.50 ml
Incubar por 5 minutos a 37° C		
Suero (fresco, no hemolizado)	0.10 ml	--
Mezclar e incubar por 30 minutos a 37° C		
Reactivo de Color (2)	0.50 ml	0.50 ml
Estándar	--	0.10 ml
Mezclar e incubar exactamente 20 minutos a Temp. ambiente		

Sol. NaOH (3) 5.00 ml 5.00 ml

Mezclar y después de 5 a 30 minutos medir la absorbancia de la muestra a una longitud de onda de 500-560 nm.

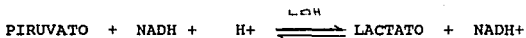
Usando los valores de la absorbancia de las muestras, leer la actividad enzimática en U/L apartir de la curva de calibración.

10. DESHIDROGENASA LACTICA (DHL)

Método. Automatizado, UV.

Equipo. Express 550

La proporción del consumo del NADH es determinada fotométricamente y es directamente proporcional a la actividad de la DHL en la muestra.



Micrométodo.

Pipetear en una micropipeta

Suero o plasma	10	ul
Sol. de Reacción	500	ul

Mezclar y después cerca de un minuto medir el descenso de la absorbancia a 25° C cada minuto durante 3 minutos, a una longitud de onda de 340 nm.

La actividad de la enzima = [(A/min) F (U/I)]

11. BILIRRUBINA DIRECTA, INDIRECTA Y TOTAL

Método. Automatizado, Colorimétrico.

Equipo. Express 550

La reacción de la bilirrubina con el ácido sulfanílico diazo da una coloración roja a pH neutro y azul en soluciones alcalinas. Dónde la bilirrubina glucoronidas solubles en agua reaccionan directamente, la bilirrubina libre (indirecta) reacciona sólo con la presencia del acelerador.

La bilirrubina total en suero o en plasma es determinada usando el método de JENDRASSIK and GROF por acoplamiento con el ácido sulfanílico diazo después de la adición de la cafeína, benzoato de sodio y acetato de sodio. La azobilirrubina azul es formada en la solución alcalina de Fehling II. Este compuesto azul puede ser determinado selectivamente en la presencia de productos amarillos (mezcla de colores verdes) por fotometría a una longitud de onda de 578 nm.

BILIRRUBINA TOTAL

REACTIVOS	MUESTRA	PATRON
Sol. Diazo	50 ul	-
Sol. ácido sulfanílico (1)	--	50 ul
Acelerador (3)	200 ul	200 ul
Suero, plasma	50 ul	50 ul
Mezclar, dejar reposar a 15-25°C por 10-60 minutos		
Sol. Fehling II (4)	200 ul	200 ul

Mezclar y después de 5 minutos medir la absorbancia de la muestra (A) contra la muestra blanco a una lóngitud de onda de 578 nm.

BILIRRUBINA DIRECTA

REACTIVO	MUESTRA	PATRON
Sol. Díazo	50 ul	--
Sol. ácido sulfanílico (1)	--	50 ul
Sol. salina fisiológica	500 ul	500 ul
Suero, plasma	50 ul	50 ul

Mezclar inmediatamente, dejar reposar a 15-25 exactamente 5 minutos después de adicionar el suero/plasma, medir la absorbancia (A) a la muestra.

Cálculos:

La concentración de Bilirrubina = $Ab \times F$

F Micrométodo	mg/dl	uml/L
Bilirrubina Total	8.60	147
Bilirrubina Directa	13.70	235

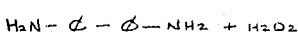
BILIRRUBINA TOTAL=BILIRRUBINA DIRECTA +BILIRRUBINA INDIRECTA

12. DETERMINACION DE HEMOGLOBINA LIBRE (Hb⁺)

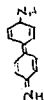
Método. Manual, Colorimétrico.

Equipo. Coleman Jr. IIA

Se basa en la acción catalítica de las proteínas que contienen el grupo hem, producen una oxidación de la Bencidina por el peróxido de hidrogeno obteniendose una coloración verdosa que cambia a azul y posteriormente al rojo violeta.



$\xrightarrow{\text{Peroxidase}}$



+ 2H₂O

A 1 ml. de bencidina base 1% en ácido acético al 90% adicionar 0.02 ml de la solución a evaluar (suero del paciente y hemolizado estándar) posteriormente adicionar 1 ml. de una solución de peróxido de hidrógeno 1%.

Mezclar vigorosamente y dejar reposar durante 20 minutos, posteriormente adicionar 10 mls. de ácido acético al 10%, dejar reposar durante 10 minutos a temperatura ambiente, después de mezclar y leer en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 515 nm.

Cálculos:

Ab problema X A X Dilución del problema
Ab estándar

A= Sedimentación estándar Hb (mg/100 ml)

REACTIVOS	BLANCO	ESTANDAR	MUESTRA
Sol. Bencidina 1%	1.00ml	1.00 ml	1.00ml
Suero del paciente	--	--	0.02ml
Hemolizado estándar	--	0.02 ml	-
Sol. Peróxido de Hidrógeno al 3 %	1.00ml	1.00 ml	1.00ml
M E Z C L A R Y D E J A R R E P O S A R 20p			
Sol. ácido acético al 10 %	10.00ml	10.00 ml	10.00ml
D E J A R R E P O S A R 10p A T E M P . A M B I E N T E			

Leer la absorbancia de la muestra a una longitud de onda de 515 nm.

13.DETERMINACION DE METAHEMOGLOBINA Y PIGMENTO DE METAHEMO- BINA EN SANGRE.

Método. Manual, Colorimétrico.

Equipo. Colleman Jr. IIA.

La Metahemoglobina (MHb) es un tipo de hemoglobina en la cual el ión ferroso ha sido oxidado al estado férrico, tiene la máxima adsorción a 630 nm. Cuando se añade cianuro esta banda de absorción desaparece y el cambio resultante en la densidad óptica es directamente proporcional a la concentración de MHb.

densidad óptica es directamente proporcional a la concentración de Mhb.

Pipetear 0.1 ml. de sangre fresca completa en una solución de tampón de fosfato M/60 de 10 ml. Mezclar bien y leer la absorbancia a 630 nm., calibrar con agua o tampón, esta lectura es Absorbancia "A".

Añadir una gota de cianuro neutralizado a la cubeta agitar y practicar una segunda lectura de la absorbancia a 630 nm., 1 o 2 minutos después. El tiempo de la no es crítica pero si debe ser constante. Esta lectura es Absorbancia "B".

Pipetear 2 ml. del contenido de la cubeta a 8 ml. de tampón fosfato M/15. Añadir una gota de ferrocianuro potásico al 20%. Añadir una gota de la solución de cianuro sódico.

Esperar por lo menos 2 minutos y leer la absorbancia a 540 nm., calibrar con el tampón fosfato M/15. Esta lectura es Absorbancia "C".

Cálculos:

Metahemoglobina (g/dl) = (Ab "A" - Ab "B") X FA

% de Pigmento que es Mhb = $\frac{Ab "A" - Ab "B"}{Ab "C"} \times FB$

Con el empleo de un Espectrofotómetro Colleman Jr. IIA con cubetas de 25 mm. Se puede emplear estos factores:

Factor A (FA) = 35

Factor B (FB) = 84

METODO

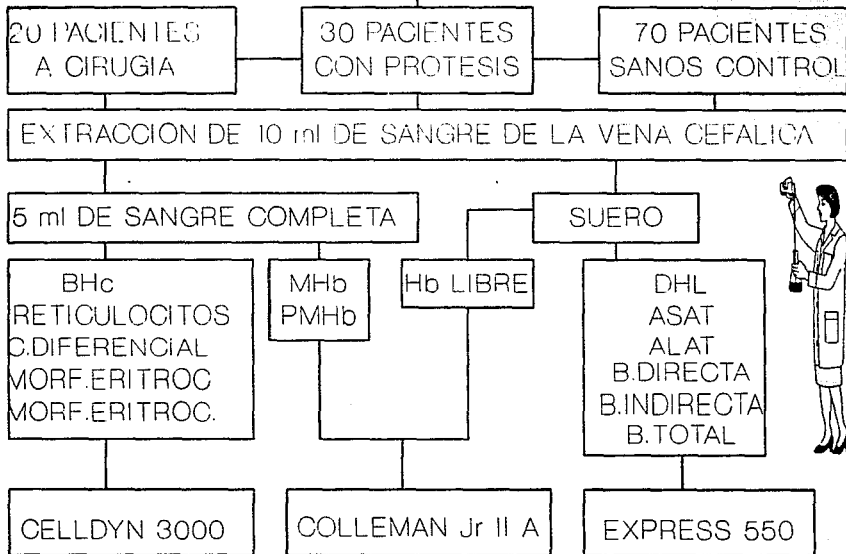


DIAGRAMA I

DISEÑO ESTADISTICO

Tomando en cuenta el nivel de medición de las variables que se estudiaron, así como las características del tipo de estudio realizado, los estudios obtenidos fueron sometidos al análisis estadístico propuesto por W. S. Gosset: " La distribución t student" (CUADRO II) y el Análisis de Varianza (ANDEVA) descrita por Sir R. A. Fisher (CUADRO III).

A. TERMINOS ESTADISTICOS

Las pruebas estadísticas que se presentan a continuación permiten demostrar la confiabilidad diagnóstica de los datos clínicos y exámenes de laboratorio.

Σ	Sumatoria
>	Mayor que
≥	Mayor o igual a
<	Menor que
≤	Menor o igual a
p	Probabilidad de éxito en un evento
≈	Aproximadamente igual a
g.l	Grados de libertad
μ	Media Muestral
σ	Desviación estándar
n	Tamaño de la muestra
H ₀	Hipótesis nula

- μ Media de una población de probabilidad de una población
- Δ_0 Diferencia supuesta
- H_a Hipótesis alternativa
- $1-\alpha$ Nivel de confianza
- α Nivel de significación
- t Variable aleatoria de t de student
- F Variable aleatoria de F de Fisher
- X_{ij} i -ésima observación que recibe el j -ésimo tratamiento
- $X_{.j}$ Suma de j -ésimo tratamiento
- $X_{i.}$ Media de j -ésimo tratamiento
- $X_{..}$ Suma de todas las observaciones
- $X_{..}$ Gran media

"t de student"
CUADRO II

HIPOTESIS A CONTRASTAR	SUPUESTOS	ESTADIGRAFO DE CONTRASTE	g.l
Ho: $\mu_1 = \mu_2 = 0$	Muestras Independientes	$t = \frac{\bar{x}_A - \bar{x}_B}{\sqrt{\frac{\sum x_A^2 + \sum x_B^2}{n_A + n_B - 2} \left(\frac{1}{n_A} + \frac{1}{n_B} \right)}}$	nA+nB-2

CUADRO III ANALISIS DE VARIANZA PARA EL DISEÑO COMPLETAMENTE ALEATORIO

FUENTE DE VARIACION	g.l	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS	Fc	Ft
Entre Tratamientos	K-1	$\sum_{j=1}^K \frac{x_j^2}{n_j} - \frac{x_{..}^2}{N} = SC_{\text{trat}}$	$CM_{\text{trat}} = \frac{SC_{\text{trat}}}{K-1}$	$F_{\text{calculada}} = \frac{CM_{\text{tratamiento}}}{CM_{\text{error}}}$	$F_{\text{teórica}} = F_{\alpha, k-1, N-k}$
Dentro Tratamientos	N-k	$\sum_{j=1}^K \sum_{i=1}^{n_j} x_{ij}^2 - \sum_{j=1}^K \frac{x_j^2}{n_j} = SC_{\text{error}}$	$CM_{\text{error}} = \frac{SC_{\text{error}}}{N-K}$		
Total	N-1	$\sum_{j=1}^K \sum_{i=1}^{n_j} x_{ij}^2 - \frac{x_{..}^2}{N} = SC_{\text{total}}$	—		

RESULTADOS

Fueron incluidos 70 sujetos sanos como control (GRUPO I) y 30 pacientes portadores de válvula mecánica de aplicación crónica (3 meses a 8 años de tiempo de implante GRUPO II).

Y 20 pacientes que fueron seleccionados prospectivamente (GRUPO III) a los que se le implantó prótesis valvular tipo sorín en los siguientes períodos: Prebomba, 10, 30, 70 y 80 días postbomba con una edad media de 43 años (con un rango de 15 a 61 años de edad), sometidos a cirugía con una media de tres horas y empleándose una Bomba Extracorpórea COBE de rodillos y flujo continuo (CUADRO IV).

No se incluyen aquellos padecimientos que en forma aguda o crónica tuvieran relación con la hemólisis o relación enzimática para efectos de este estudio tales como:

- Pacientes Diabéticos
- Pacientes Hipercolesterolémicos
- Pacientes que cursan un estado anémico
- Pacientes con anemias hemolíticas autoinmunes y
- Pacientes con sangrados o hepatopatías

**DATOS CLINICOS DE LOS GRUPOS ESTUDIADOS
(CUADRO IV)**

El estudio realizado se baso en trabajar con tres grupos de pacientes diferentes:

El GRUPO I. Pacientes ambulatorios que acudian a consulta externa en el Hospital de Cardiología, sin antecedentes quirúrgicos cardíacos. Se trabajó como grupo control para la obtención de valores de referencia de los parámetros hemolíticos en base a las condiciones en que se laboró.

El GRUPO II. Pacientes ambulatorios con implante valvular cardíaco que acudian al laboratorio clínico del Hospital de Cardiología "LUIS MENDEZ" , para determinarles las pruebas de TROMBOTEST.

El GRUPO III. Pacientes hospitalizados en el Centro Médico Nacional Siglo XXI, Hospital de Cardiología, los cuales fueron sometidos a cirugía a corazón abierto, debido a implante valvular. Grupo de estudio, a los cuales se les realizó una evaluación hematológica en diferentes periodos: Prebomba y postbomba (10, 30, 70 y 80 días).

En el CUADRO IV aparecen los principales datos clínicos de estos grupos.

DATOS CLINICOS DE LOS GRUPOS ESTUDIADOS

CUADRO IV

DATOS	GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III
EDAD X	45 años	47 años	43 años
DES. ESTAN	14.90a	14.39a	12.19a
n	70	30	20
n HOMBRES	34	11	08
n MUJERES	36	19	12

**VALORES MEDIOS DE LA BIOMETRIA HEMATICA EN PACIENTES
CONTROL, CON IMPLANTE Y A CIRUGIA.
CUADRO V**

No se encontró diferencia en los resultados (excepto en los valores de linfocitos) en los tres grupos estudiados, sin embargo la hemólisis se vió expresada en la intensidad y tiempo de acuerdo al GRUPO III, pacientes con cirugía de corazón.

VALORES MEDIOS DE LA BIOMETRIA HEMATICA

CUADRO V

VAR	PREB	1o	3o	7o	8o	GII	GI
Hb(g/dl)	14.31	12.42	11.81	12.34	13.28	15.22	14.84
Hto(%)	43.60	37.62	36.02	37.30	40.33	46.23	45.14
Leucos(mm3)	7086	12815	12585	11430	12150	6890	6687
Linfoc(%)	30.76	5.06	4.79	8.35	10.67	28.70	32.41
Monoc(%)	6.35	6.34	5.54	5.90	6.80	4.73	4.03
Eosin(%)	1.83	0.64	0.95	0.95	2.40	2.80	3.03
Basof(%)	0.44	0.35	0.33	0.65	0.97	0.40	0.39
Seg(%)	60.58	87.34	88.00	84.08	79.20	62.80	59.59
Band(%)	0.1	0.65	0.40	0.05	0.00	0.57	0.66
Retlc(%)	0.96	1.22	1.36	1.28	1.37	1.71	1.59

**VALORES MEDIOS DE LAS DIFERENTES DETERMINACIONES REALIZADAS
PARA LA EVALUACION HEMOLITICA (CUADRO VI).**

**RESULTADOS DE LA APLICACION DE LA t de student A LOS GRUPOS
II Y III (CUADRO VII).**

En los CUADROS VI y VII se expresan los valores medios y probabilidades respectivamente, en el último cuadro cada una de las etapas se comparán contra el control.

Existe una diferencia significativa en el GRUPO II comparado con el GRUPO I, en los siguientes analítos: ASAT, DHL, Hb \dagger , Mhb y PMhb. Los pacientes cursan anemia sin evidencia clínica y una hemólisis de tipo crónica.

En el GRUPO III presenta a su vez una diferencia significativa en todas las determinaciones químicas durante las diferentes etapas. Y por lo tanto el paciente cursa una hemólisis de tipo aguda.

**VALORES MEDIOS PARA LAS DIFERENTES DETERMINACIONES
REALIZADAS PARA LA EVALUACION HEMOLITICA
CUADRO VI**

VAR	PREB	1o	3o	7o	8o	GII	GI
B.D(mg/dl)	0.15	1.67	1.59	0.77	1.42	0.14	0.10
B.I(mg/dl)	0.76	1.79	1.97	1.32	1.18	0.62	0.50
B.T(mg/dl)	0.91	3.46	3.81	2.08	2.60	0.77	0.70
ASAT(u/ml)	17.50	92.05	102.70	54.96	33.50	25.77	20.20
ALAT(u/ml)	16.75	56.45	55.40	35.10	25.67	28.20	26.60
DHL(u/ml)	154.45	326.75	474.80	332.55	268.33	174.33	127.20
Hbt(g/dl)	2.73	16.45	25.31	14.60	11.16	8.13	3.50
MHb(g/dl)	0.18	0.21	0.27	0.12	0.03	0.10	0.20
PMHb(%)	0.49	0.62	0.77	0.35	0.08	0.88	0.50
L.Tot(mm3)	2138	636	567	901	1994	1704	2152

**RESULTADOS DE LA APLICACION DE LA "t student"
A LOS GRUPOS II Y III
CUADRO VII**

VAR	PREB	1o	3o	7o	8o	GII
B.D	0.350	0.0005*	0.0005*	0.0005*	0.0005*	0.3500
B.I	0.200	0.0005*	0.0005*	0.0005*	0.2500	0.2200
B.T	0.100*	0.0005*	0.0005*	0.0005*	0.0005*	ns
ASAT	0.220	0.0005*	0.0005*	0.0005*	0.1000*	0.1000*
ALAT	0.100*	0.0005*	0.0005*	0.1000*	ns	0.3500
DHL	0.2200	0.0005*	0.0005*	0.0005*	0.0100*	0.1000*
Hb ↑	0.220	0.0005*	0.0005*	0.0005*	0.0005*	0.0050*
MHb	0.220	0.2200	ns	0.0500	0.0500*	0.0100*
PMHb	0.0100*	0.0100*	0.0100*	0.0050*	0.0500*	0.1000*
L.Tot	ns	0.0050*	0.0050*	0.1000*	0.0005*	ns

**APLICACION DEL ANALISIS DE VARIANZA (ANDEVA) A CADA UNA DE
LAS DETERMINACIONES HEMOLITICAS DEL GRUPO III EN LAS
DIFERENTES ETAPAS DEL ESTUDIO (CUADRO VIII).**

Cada una de estas determinaciones químicas en estas poblaciones con excepción de la Mhb y el PMhb son significativamente diferentes al 5% de significancia.

La Mhb y PMhb no presentan significativamente diferencia estadística en la evaluación de cada una de las etapas. Sin embargo las es evidente el incremento de cada uno de sus valores en la etapa posquirúrgica, lo cual indica el estado hemolítico por el cual cursa el paciente.

**DETERMINACION DE LA ANDEVA EN CADA UNA DE
LAS DETERMINACIONES HEMOLITICAS
CUADRO VIII**

ANALITOS	Fcalculada	Fteórica	Ho
Hb	20.76	2.76	Se rechaza
Hto	20.27	2.76	Se rechaza
Retfcuculoctos	4.99	2.76	Se rechaza
Linfocitos	10.14	2.76	Se rechaza
B.D	88.45	2.76	Se rechaza
B.I	5.59	2.76	Se rechaza
B.T	8.92	2.76	Se rechaza
ASAT	10.85	2.76	Se rechaza
ALAT	10.19	2.76	Se rechaza
DHL	35.50	2.76	Se rechaza
Hb I	63.76	2.76	Se rechaza
MHb	0.25	2.76	No se rechaza
PMHb	0.2577	2.76	No se rechaza

MORFOLOGIA ERITROCITARIA
(CUADRO IX)

En frotis teñidos de sangre periférica suele haber manifestaciones netas de la anomalía congénita o adquirida de la estructura de los eritrocitos, en forma de esferocitosis, poiquilocitosis, anisocitosis o piteado basófilo.

Podemos detectar si el paciente cursa un cuadro de hemólisis basandonos en su morfología eritrocitaria:

a) Una disminución de la concentración de hemoglobina total (hipocromía), disminución del tamaño celular (microcítica) y alteración en la permeabilidad de su membrana (esferocitosis), conlleva a un incremento de la concentración de la Hb^f, lo cual indica que el paciente está hemolizando. El 43.75% de los pacientes lo presentaron.

b) Aún cuando el paciente no presenta alteración en el tamaño globular (normocitosis), pero si en su concentración de Hb eritrocitaria (hipocromía), el paciente cursa un estado hemolítico y lo presento el 25% de los pacientes.

En ambos casos los pacientes sufren un cuadro hemolítico tipo intravascular, atribuido al empleo de la Bomba

Extracorpórea COBE durante la cirugía y al implante valvular cardíaco.

MORFOLOGIA ERITROCITARIA

CUADRO IX

MORFOLOGIA	Hb TOTAL	Hb LIBRE	% CASOS
MICROCITICA HIPOCROMICA ESFEROCITICA	BAJA	ELEVADA	43.75%
HIPOCROMICA NORMOCITICA	BAJA	ELEVADA	25.00%
NORMOCITICA NORMOCROMICA	NORMAL	NORMAL	15.63%

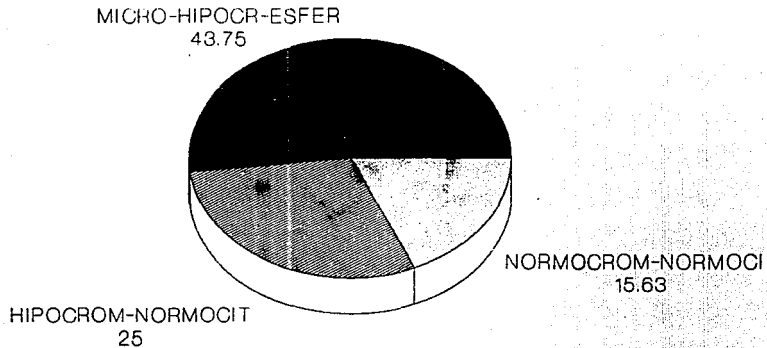
**MORFOLOGIA ERITROCITARIA
(GRAFICA I)**

A los pacientes con cirugía de prótesis válvular se les realizó una evaluación de la morfología eritrocitaria como un parámetro de hemólisis.

El 43.75% de los pacientes presentaron una morfología microcítica, hipocrómica esferocítica y el 25% hipocrómica y normocítica lo cual indica una liberación de la Hb eritrocitaria. Lo cual indica una elevación de la Hb circulante.

El 15.63% corresponde a eritrocitos normales los cuales probablemente no fueron afectados durante el procedimiento.

MORFOLOGIA ERITROCITARIA



GRAFICA I

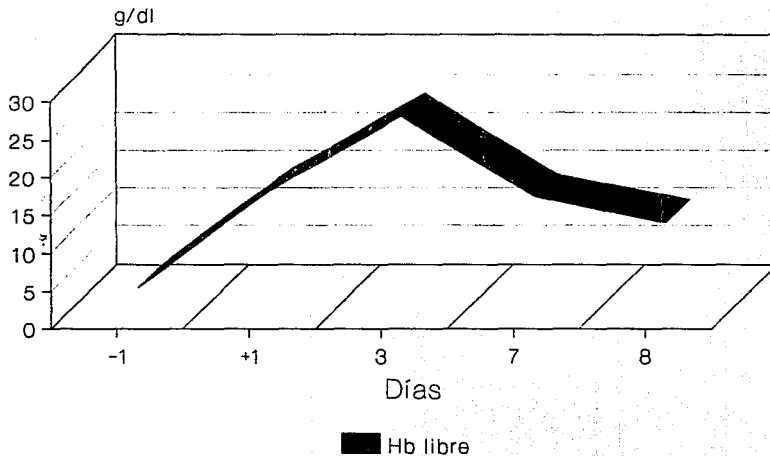
**HEMOGLOBINA LIBRE EN PACIENTES CON IMPLANTE VALVULAR
(GRAFICA II)**

A los pacientes con cirugía a corazón abierto se les determinó en diferentes etapas la concentración de Hb circulante (g/dl) por el método de la reacción de la Bencidina (36).

La primera muestra se tomó un día antes de la cirugía (-1), correspondiente a la muestra basal. Las siguientes muestras corresponden después que el paciente sufrió la intervención quirúrgica en las siguientes etapas 1o, 3o, 7o y 8o días.

En la gráfica se detecta un pico máximo al 3er día postbomba alcanzando niveles de 25.31 g/dl de Hb[†], que posteriormente desciende hasta el 8o día a 11.16 g/dl de Hb[†].

HEMOGLOBINA LIBRE IMPLANTE VALVULAR



GRAFICA II n-20

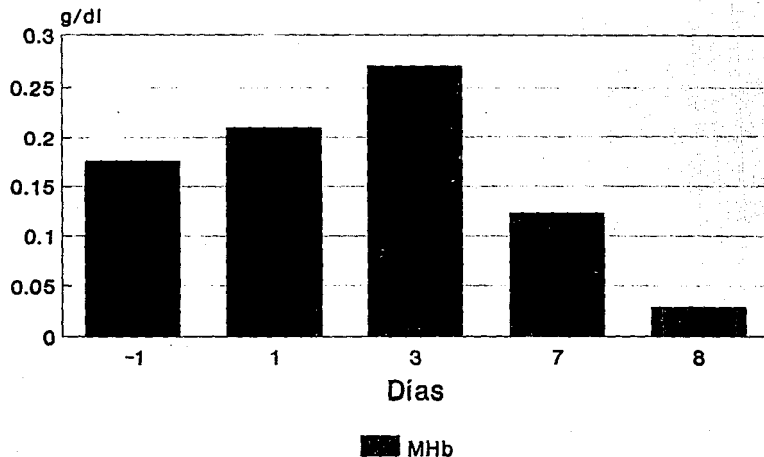
**METAHEMOGLOBINA EN PACIENTES CON IMPLANTE VALVULAR
(GRAFICA III)**

A los pacientes con cirugía a corazón abierto se les determinó en diferentes etapas la concentración de Metahemoglobina Mhb en sangre total (g/dl) por el método de la reacción con cianuro neutralizado (36).

La muestra basal corresponde a un día anterior al que el paciente sufriera la intervención quirúrgica (- 1), las siguientes muestras corresponden a la etapa postquirúrgica durante los siguientes etapas: 1o, 3o, 7o y 8o días.

En la gráfica se observa un pico máximo al 3er día postbomba alcanzando niveles de 0.271 g/dl, que posteriormente desciende hasta el 8o día a 0.029 g/dl.

METAHEMOGLOBINA IMPLANTE VALVULAR



GRAFICA III n°20

**PIGMENTO DE METAHEMOGLOBINA EN PACIENTES CON IMPLANTE
VALVULAR**

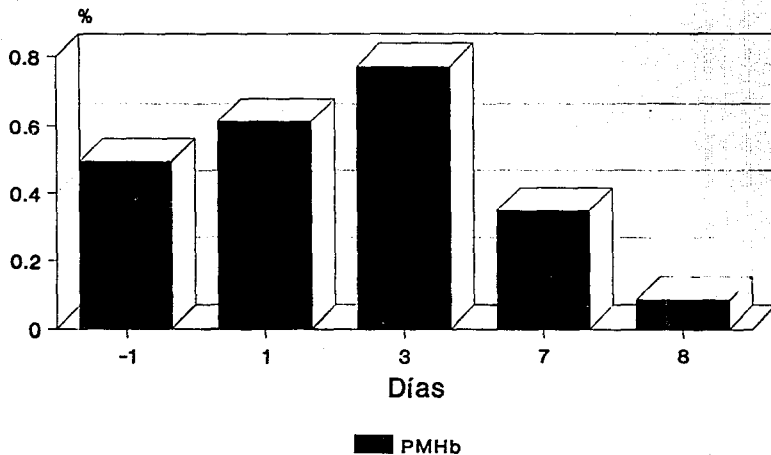
(GRAFICA IV)

A los pacientes con cirugía a corazón abierto se les determinó en diferentes etapas la concentración del PMHb en sangre total (%), por el método de la reacción con cianuro neutralizado (36).

La muestra basal corresponde a un día antes de la operación (-1) y las siguientes muestras corresponden posterior a la cirugía durante el 1o, 3o, 7o y 8o días.

En la gráfica se observa un pico máximo al 3er día postbomba alcanzando un nivel de 0.772 %, posteriormente desciende hasta el 8o día a 0.500%.

PIGMENTO DE Mhb IMPLANTE VALVULAR



GRAFICA IV n=20

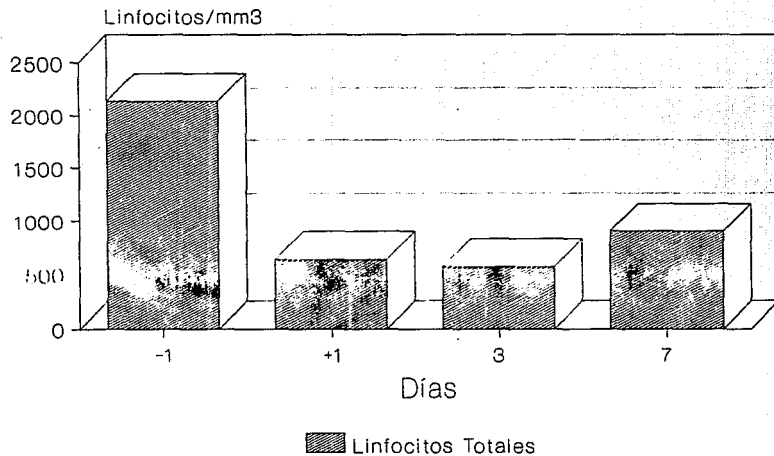
**LINFOCITOS TOTALES EN PACIENTES CON IMPLANTE VALVULAR
(GRAFICA V)**

A los pacientes con implante de prótesis valvular se les determinó en diferentes etapas los valores absolutos de linfocitos totales (linfocitos/mm³) por el método automatizado Celldyn 3000 (36).

La muestra basal corresponde a un día antes de la cirugía (-1) y las siguientes muestras corresponden a la etapa posquirúrgica durante el 1o, 3o, 7o y 8o días.

En la gráfica se observa un pico extremo descendente al 3er día postbomba alcanzando niveles de 566.54/mm³ y ascender posteriormente hasta el 8o día a 1,994.10/mm³.

LINFOCITOS TOTALES IMPLANTE VALVULAR



GRAFICA V n=20

NIVELES DE DESHIDROGENASA LACTICA EN PACIENTES CON IMPLANTE VALVULAR

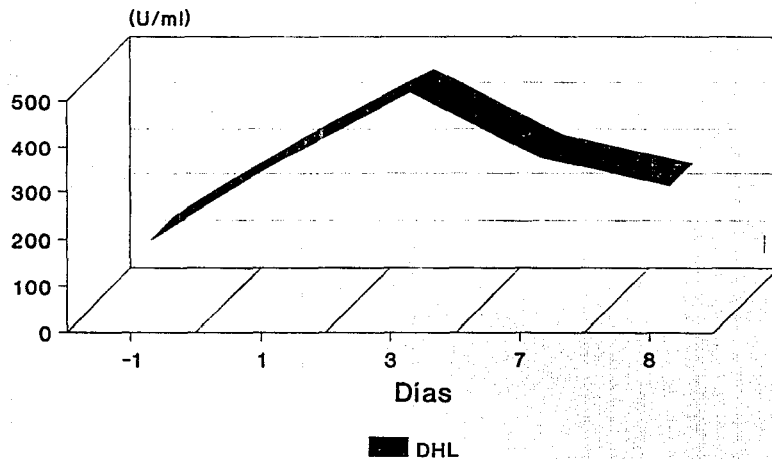
(GRAFICA VI)

A los pacientes con implante valvular cardíaca se les determinó durante las diferentes etapas los niveles de la DHL sérica (U/ml), por el método automatizado y UV (36).

La muestra basal corresponde a un día antes de la cirugía (-1) y las siguientes muestras corresponden a la etapa posquirúrgica durante el 1o, 3o, 7o y 8o días.

En la gráfica se observa un pico máximo que corresponde a los niveles de 474.80 U/ml que posteriormente desciende a 268.33 U/ml al 8o día.

DESHIDROGENASA LACTICA IMPLANTE VALVULAR



GRAFICA VI n=20

DISCUSION DE RESULTADOS

Una serie de estudios informa que cerca de la mitad de los pacientes sobreviven al reemplazo valvular mueren o tienen serias complicaciones varios años después de la operación.

Las principales complicaciones que puede sufrir el paciente cardiópata son la Endocarditis Infecciosa, Tromboembolismo, Disfunción de prótesis y Hemólisis.

El incremento intravascular hemolítico ocurre en la mayoría de los pacientes con implante valvular mecánico y en pocas ocasiones por reemplazo valvular con prótesis biológicas. El trauma mecánico que sufren los eritrocitos debido a la turbulencia del flujo sanguíneo a través de la prótesis, permite la liberación de la hemoglobina eritrocitaria al espacio extracélular. Ocasionando que el paciente curse un cuadro hemolítico, el cual puede ser de diferentes grados: Ligero, moderado o severo hasta llegar a fatal, esto puede conducir al paciente a la muerte debido a su estado hematológico.

Integrando los resultados de los CUADROS VI y VII se observa concordancia con la Hipótesis expuesta, debido a que el grupo de pacientes con cirugía de corazón presentó un incremento del nivel de Hemoglobina libre (Hb) en suero, Metahemoglobina (MHb) y Pigmento de Metahemoglobina (PMHb).

así como de las pruebas complementarias B.D., B.I., B.T., ASAT y DHL.

La morfología eritrocitaria fue afectada obteniéndose el 43.75% de los casos de hipocromía microcítica esferocítica y el 25% presentó un cuadro hipocrómico normocítico, lo cual indica una disminución de la concentración de la hemoglobina total y un incremento de la hemoglobina libre en plasma. El 15.63% corresponde a eritrocitos normales los cuales no fueron afectados por el implante valvular o el empleo de la Bomba Extracorpórea COBE durante la cirugía, observado en el CUADRO IX (GRAFICA I).

Los pacientes con implante de prótesis (GRUPO II) cursan con una Hemólisis Crónica debido a que presentan un incremento de los niveles de Deshidrogenasa Láctica (DHL), Hemoglobina libre ($Hb \uparrow$), Metahemoglobina (MHb) y Pigmento de Metahemoglobina (PMHb): 174.33 u/ml, 8.13 g/dl, 0.10 g/dl y 0.88 % respectivamente.

Los pacientes del GRUPO III cursan una Hemólisis Aguda ya que los niveles de Bilirrubina Directa (B.D), Bilirrubina Indirecta (B.I), Bilirrubina Total (B.T), Aspartato Amino Transferasa (ASAT), Alanin Amino Transferasa (ALAT), Deshidrogenasa Láctica (DHL), Hemoglobina libre ($Hb \uparrow$), Metahemoglobina (MHb) y Pigmento de Metahemoglobina (PMHb) presentan un incremento durante la evaluación.

Estos pacientes sometidos a cirugía presentaron un pico máximo de Hb⁺, MHB y PMHB al tercer día después de la operación, posteriormente estos niveles descendían hasta alcanzar una media de 11.16 g/dl, 0.096 g/dl y 0.884% respectivamente, hasta el octavo día de estudio, y sin embargo los pacientes aún se encontraban hemolizando debido a que los valores aún se mantenían elevados (GRAFICAS II, III y IV).

Los pacientes con cirugía a corazón abierto presentaron una linfocitopenia. El valor medio de linfocitos totales circulantes antes de la operación corresponde a 2138.34/mm³ los cuales alcanzaron un pico extremo descendente al tercer día postquirúrgico correspondiente a un valor medio de 566.54/mm³ con una significancia estadística de $p = 0.995$ y $\alpha = 0.005$ (GRAFICA V)

La determinación de la Deshidrogenasa Láctica Sérica es una prueba sensible además de económica que se recomienda para tamizaje y seguimiento de la hemólisis intravascular. Con base en los niveles de la DHL podemos clasificar el estado hemolítico con que cursan estos pacientes como una hemólisis ligera, debido a que no se sobrepasa los 500 U/ml de la prueba (GRAFICA VI).

Durante la evaluación de la hemólisis en estos pacientes se trabajo con un paciente VIH+ presentando una hemólisis aguda, una linfocitopenia severa y sin embargo con una recuperación positiva a la cirugía.

Un paciente de sexo femenino, edad 37 años presentó en la etapa postquirúrgica una inflamación torácica severa y falleció debido a una septicemia al 13avo día posterior al implante de prótesis.

Por lo tanto se puede mencionar como posibles causas de los niveles elevados de Hb[↑], MHB y PMHB en la circulación sanguínea :

1. Material de la válvula
2. Turbulencia causada por el incremento de la resistencia del flujo, el cual es el resultado del incremento del gradiente de presión o del decremento del área del orificio.
3. Regurgitación Transvalvular
4. Variación del Balón
5. Fenómeno autoinmune
6. Empleo de Bomba Extracorpórea Cobe de rodillo y flujo continuo durante la cirugía así como la presencia de pasajes estrechos de la misma.
7. El material y tamaño del tubo de la bomba
8. Una succión y presión elevada aplicada a la sangre
9. Posible oclusión de la Bomba la cual produce una

turbulencia y por lo tanto un daño sanguíneo.

Todos estos puntos pueden ser afectados por diversos factores los cuales son de gran importancia clínica:

- a. Estado nutricional del paciente
- b. Estado inmunológico del paciente
- c. Deficiencia de hierro
- d. Estado anémico que puede cursar el paciente

Y por lo tanto uno o ambos repercuten al estado hematológico del paciente.

CONCLUSIONES

La hemólisis eritrocitaria es un cuadro clínico que los pacientes con prótesis valvular pueden cursar después del implante, durante el trauma trans y postquirúrgico sometido a Bomba extracorpórea, clínicamente puede conducir a una anemia hemolítica adquirida.

La hemólisis se evalúa a través del análisis de acuerdo a la sensibilidad de la Hemoglobina libre, Metahemoglobina y Pigmento de Metahemoglobina, en los pacientes portadores de válvula cardíaca en forma crónica. En todos los sujetos sometidos a implante cardíaco y Bomba extracorpórea durante la intervención quirúrgica, hasta los 8 días que duro el estudio cursan una hemólisis aguda, aunque no existe traducción clínica la hemólisis es evidente en todos los portadores de la válvula cardíaca mecánica.

Se encontró que estos pacientes presentan hemólisis demostrada con base en las pruebas químicas sensibles como lo es la determinación de la Hemoglobina libre ($Hb\uparrow$), Metahemoglobina (MHb) y Pigmento de Metahemoglobina (PMHb) circulantes.

La determinación de estos analitos no ha sido considerado como parámetro de seguimiento, se demostró en este estudio su utilidad como pruebas significativas ($p= 0.005$), cuyo

incremento es directamente proporcional al grado de hemólisis.

Como dato no informado en la literatura se demostró una linfocitopenia significativa ($p= 0.005$), en el período postbomba, el cual se atribuye a una participación de éstas células en los procesos traumáticos o inflamatorios. Es importante continuar esta investigación científica del "secuestro linfocítico" posible de una respuesta del Sistema Inmune Celular o debido al material empleado durante la cirugía y terapia postquirúrgica como lo es la Bomba Extracorpórea COBE de flujo continuo y el Oxigenador de Burbuja. Sin dejar de considerar el estado del paciente, como lo es su incapacidad para enfrentar un estímulo adecuadamente con sus consecutivas respuestas emocionales o psicológicas "stress", lo cual conlleva a una disminución de los linfocitos.

PROPUESTAS Y RECOMENDACIONES

- A. Realizar otras determinaciones químicas para la evaluación hemolítica como lo es:
Determinación de Hierro (Fe⁺⁺), Transferrinas y Haptoglobinas.
- B. Con base en éste estudio se propone continuar con una investigación científica con el fin de determinar:
1. ¿Porqué los pacientes con cirugía a corazón abierto cursan una Linfocitopenia severa?
Por lo que se puede determinar las subpoblaciones de Linfocitos CD4 y CD8 antes, durante y después de la cirugía.
 2. Si existe un secuestro de ésta línea celular ¿Qué factores son los que intervienen ?, ¿Porque lo producen? y ¿Dónde se encuentran estas células?
Por lo que se propone realizar una biopsia de Ganglio Linfático, aunque es un procedimiento agresivo por lo que se debe valorar probablemente a través de animales experimentales de laboratorio, específicamente en Conejo.
 3. Realizar pruebas para valorar la respuesta Inmune tales como IgG, e investigar perfil viral para citomegalovirus, toxoplasma, VIH y hepátitis.
- C. Establecer de rutina las pruebas de Hemoglobina libre, Metahemoglobina y Pigmento de Metahemoglobina para la evaluación hematológica, así como las cifras absolutas de linfocitos.

ANEXOS

A. VALORES DE REFERENCIA:

DETERMINACION		HOMBRES	MUJERES
Hemoglobina	(g/dl)	15-20	13.5-17
Hematocrito	(%)	45-60	40-52
Reticulocitos	(%)		0.5-2.0
Leucocitos	(K/dl)		5000-10,000
Lincocitos totales	(K/dl)		1000-4,000
<u>Diferencial:</u>			
Linfocitos	(%)		24-38
Monocitos	(%)		4-9
Eosinófilo	(%)		1-4
Segmentados	(%)		50-70
Basófilos	(%)		0-1
Banda	(%)		0-7
Bilirrubina Directa	(mg/dl)		0.0-0.2
Bilirrubina Indirecta	(mg/dl)		0.2-0.8
Bilirrubina Total	(mg/dl)		0.2-1.0
ASAT	(U /ml)		13-33
ALAT	(U /ml)		8-30
DHL	(U /ml)		114-255
Hb†*	(g /dl)		0-5
MHb*	(g /dl)		0.0-0.4
PMHb*	(%)		0.0-0.5

Fuente: Manual de Procedimientos del I.M.S.S

* Valores obtenidos del grupo testigo de este protocolo.

B. PREPARACION DEL HEMOLIZADO:

Para los estudios hemoglobínicos convencionales, la sangre se puede colectar con cualquiera de los anticoagulantes que se utilizan en los laboratorios clínicos (Heparina, E.D.T.A., Oxalato o Citratos). Recomendamos la obtención de la sangre con EDTA 5% en tubos estériles, bajo condiciones de refrigeración (4 C), no más allá de 2 semanas.

Método de Singer et al.:

1. Centrifugar sangre anticoagulada con EDTA a 3000 r.p.m. durante 5 minutos; remover el plasma y lavar los eritrocitos tres veces con solución salina al 0.85%. Después del último centrifugado se remueve el sobrenadante de solución salina y se mide el volúmen de células empaquetadas.

2. Por cada ml de células rojas empaquetadas adicionar un ml de agua destilada y mezclar bien por 2 minutos. Añadir luego un volúmen comparable de tetracloruro de carbono (CCl₄) o en su defecto tolueno, agitar vigorosamente por unos tres minutos y centrifugar por 20 minutos a 3000 r.p.m. Si la hemólisis es incompleta lo cual es frecuente cuando hay muchas células en diana, la mezcla debe congelarse y descongelarse.

3. El hemolizado con CCl₄ queda encima de la capa de estroma y se recoge con una pipeta Pasteur. Usualmente no hay

necesidad de filtrarlo antes de su uso. El filtrado acuoso debe ser rojo rubí y cristalino.

4. Determinar la concentración de hemoglobina de los hemolizados y ajustar el concentrado de hemoglobina a 10 g/dl.

Para estudios de investigación no es aconsejable utilizar hemolizados de más de una semana.

C. LINEALIDAD ESPECTROFOTOMETRICA:

Con Anaranjado de Metilo

El anaranjado de metilo nos sirve para medir la linealidad espectrofotométrica mediante puntos isobéuticos utilizando soluciones a la misma concentración pero a diferentes pHs, un alcalino (8.0) y un ácido (4.0). Además de que variando concentraciones nos da una curva que cumple perfectamente la Ley de Beer.

Medir las extinciones de las soluciones de anaranjado de metilo: 0.20, 0.40, 0.60, 0.80 y 1.0 mg/dl a 465 nm.

Realizar la gráfica de Absorbancia contra Concentración.

Colocar un tubo de Anaranjado de Metilo de concentración conocida en el portaceldas a 465 nm, cambiar la longitud de onda y regresar a la inicial (GRAFICA VII).

D. PUNTOS ISOBESTICOS:**Con Rojo de Cresol**

Preparar una solución Madre de 1% (p/v) de rojo de cresol disolviendo 250 mg de rojo de cresol en 10 ml de alcohol y lleve al aforé de 25 ml con agua destilada.

Preparé 3 soluciones de 0.0005% de Rojo de Cresol en ácido, alcali y a un pH de 4.0 como se indica a continuación.

Añada 100 ul de la solución madre de Rojo de Cresol a

1. 100 ml de H₂SO₄ (500 mmol/L)
2. 100 ml NaOH (500 mmol/L)
3. 100 ml de Solución Tampón pH 4.0

Mida la Absorbancia de cada solución contra el blanco de H₂O en un fotómetro usando filtro correspondiente.

Grafique la Absorbancia vs Longitud de Onda del filtro para cada solución.

Repita las mediciones usando un espectrofotómetro desde 350 a 700 nm., con intervalos de 10 o 20 nm (GRAFICA VIII).

E. EQUIPO AUTOMATIZADO CELLDYN 3000

El Celldyn 3000 es un analizador hematológico designado para "diagnóstico in vitro" en los laboratorios clínicos. Se divide en dos módulos: Analizador y estación de datos.

El módulo correspondiente al analizador contiene el hardware necesario para aspirar, diluir y analizar cada muestra sanguínea.

El segundo módulo se refiere a la estación de datos, contiene la computadora, monitor y tablero.

El citómetro de flujo irradia un rayo laser, éste cruza sobre un orificio donde fluyen la muestra sanguínea, analiza y clasifica las células correspondientes a los glóbulos blancos [Fig. 6].

F. EQUIPO AUTOMATIZADO EXPRESS 550

El Express 550 contiene los siguientes componentes principales: Componente de operación, componente de manejo de muestras, componente del fotómetro y componente de reacción.

Los componentes de operación es el lazo de comunicación entre la computadora y el operador.

Los componentes del fotómetro son usados para obtener datos fotométricos. Los datos fotométricos son usados para determinar la absorvancia de las muestras. Y esta compuesto por un componente óptico y un tablero del fotómetro.

Contiene una lámpara de cuarzo con halógeno para emitir energía radiante, un policromador para dispersar la radiación y producir luz policromática y y óptica de formación de imágenes (lente plano convexo, lente biconvexo y rejilla holográfica cóncava) para enfocar la luz.

La luz de la lámpara de cuarzo con halógeno es enfocada por un lente planoconvexo al centro de la cubeta. Luego, un lente biconvexo enfoca la luz que sale de la cubeta hacia la ranura de entrada del policromador. Luego esta luz da en una rejilla holográfica cóncava que enfoca y dispersa todo el espectro de luz de primer orden a través de una matriz fotodiódica [Fig. 7].

G. ABREVIACIONES Y SIMBOLOS

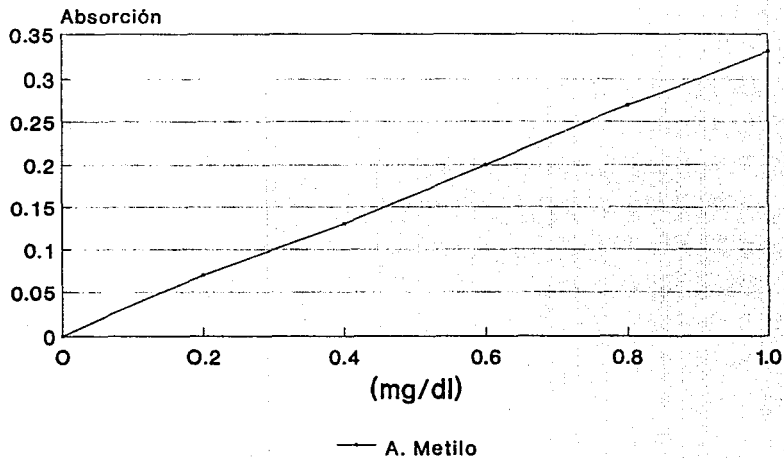
a	Años
d	Días
VAR	Variabes
PREB	Prebomba
POST-BOM	Postbomba
BD	Bilirrubina Directa
BI	Bilirrubina Indirecta
BT	Bilirrubina Total
ASAT	Aspartato amino transferasa
ALAT	Alanin amino transferasa
DHL	Deshidrogenasa láctica

Hb	Hemoglobina libre
MHb	Metahemoglobina
PMHb	Pigmento de Metahemoglobina
GI	Grupo I
GII	Grupo II
GIII	Grupo III
ns	No presenta significancia estadística
*	Presenta significancia estadística

LINEALIDAD ESPECTROFOTOMETRICA (GRAFICA VII)**PUNTOS ISOBESTICOS****(GRAFICA VIII)**

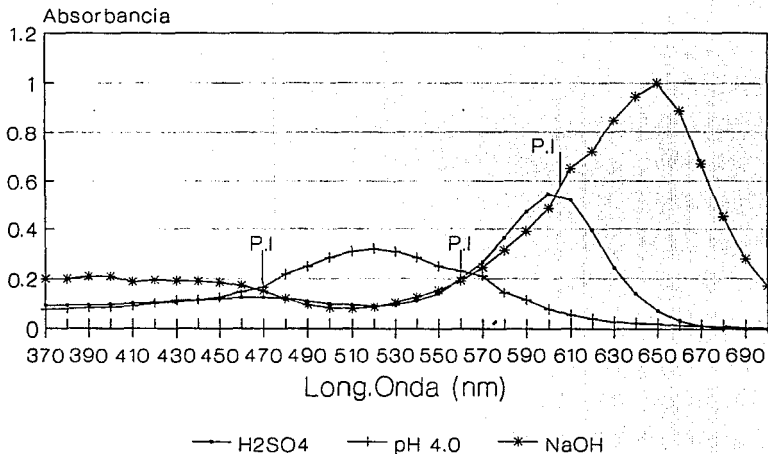
Se obtuvo una linealidad aceptable del espectrofotómetro Colleman Jr. IIA aplicada antes de iniciar el estudio. Y fue corroborada con el chequeo de la linealidad mediante la determinación de Puntos Isobésticos señalados en la GRAFICA VI correspondientes a la bibliografía..

LINEALIDAD ESPECTROFOTOMETRICA



GRAFICA VII

PUNTOS ISOSBESTICOS CURVA DE CALIBRACION



CURVA VIII n°20

BIBLIOGRAFIA

1. Latarget M., Ruiz L.A., Anatomía Humana, 2a ed,
Ed. Panamericana, México, 1991.
2. Blanc D., Cardiología y Patología Vascolar,
Ed. Norma S.A., España, 1983.
3. Schlant R. C. et al. The Year Book of Cardiology,
Ed. Mosby-Year book inc., U.S.A., 1990.
4. Braunwald E. Tratado de Cardiología, 3a ed.,
Ed. Interamericana Mc. Graw-Hill., México, 1988.
5. Dwight E., Heart Valves: Ten Commandments and Still
Counting. The Society of Surg., 1989;48:518-519.
6. Arnold J. et al. Cardiología Práctica,
Ed. Salvat, España, 1985.
7. Ruesga Z. Prótesis Valvulares Cardíacas. Rev Mex
Cardiol., 1991;2:129-134.
8. Magilligan D. et al. Hemolytic anemia with porcine
xenograft aortic and mitral valves. J Thorac Cardiovasc
Surg., 1980;79:628-631.

9. Sezai Y. et al. Hemodynamic and Hemolytic features of the St. Jude Medical Valve prosthesis. J Cardiovasc Surg., 1984;25:16-24.
10. Martínez M.A. Cateterismo Cardíaco, Diagnóstico y Tratamiento de las Cardiopatías, Ed. Trillas, México, 1990.
11. Aroj K.V. Six years of experience with St. Jude Medical Valvular prosthesis. Circulation., 1985;72(Suppl 11):153-161.
12. Monsey C.U. et al. Hemolytic anemia in a Child in association with congenital mitral valve disease. J Thorac Cardiovasc Surg., 1972;63:765-768.
13. Henderson B.J. et al. Haemolysis related to mitral valve replacement with Beall valve prosthesis. Thorac., 1973;28:488-491.
14. Myers T. J. et al. Hemolytic anemia associated heterograft replacement of the mitral valve. J Thorac Cardiovasc Surg., 1978;76:214-215.
15. Dale J. Myhre E. Intravascular hemolysis in the late course of aortic valve replacement. Relation to valve

- type, size, and function. *Am Heart J.*, 1978;96:24-29.
16. Falk R.H. et al. Intravascular haemolysis after valve replacement: Comparative study between Starr-Edwards (ball valve) and Bjork-Shiley (disc valve) prosthesis *Thorax.*, 1979;34:746-748.
17. Gupta S. C. et al. Mechanical Hemolytic Anemia After Repair of Ruptured Chordae Tendineae o Mitral Valve Apparatus. *Angiology.*, 1979;30:776-779.
18. Mok P. et al. Severe hemolytic anemia following Mitral Valve Repair. *Am Heart J.*, 1983;117:1171-1173.
19. Warnes C. et al. Mechanical haemolytic anemia after valve repair operations for non-rheumatic Mitral Regurgitation. *Br Heart J.*, 1980;44:381-385.
20. Weesner K. M. et al. Intravascular Hemolysis Associated with Porcine Mitral Valve calcification in children. *Am J Cardiol.*, 1981;47:1286-1288.
21. Goldberger A. L. et al. Severe hemolytic anemia after attempted repair of paraprosthetic mitral regurgitation. *Am Heart J.*, 1982;104:1381-1382.
22. Schaer D. H. et al. Hemolytic anemia and acute mitral regurgitation caused by a torn cusp of a porcine mitral

- prosthetic valve 7 years after its implantation. Am Heart J., 1987;113:404-406.
23. Cheng T. O., The International Textbook of Cardiology, Ed. Pergamon Press, Singapore, 1989.
24. Vallejo J. L. et al. Experiencia a largo plazo en las sustituciones polivalvulares con la prótesis mecánica de MedTronic-Hall. Rev Esp Cardiol., 1990;43:611-617.
25. Luna O. et al. Late Chronic Hemolysis after valve Replacement for Aortic Stenosis. Relation to Residual Hypertrophy and impaired Left Ventricular Function. Angiology., 1990;Oct:836-846.
26. Bloom R. J. Hemolysis After Valve Repair. Ann Thorac Surg., 1991;51:521-526.
27. Wilson J. H. et al. Severe Hemolysis after Incomplete Mitral Valve Repair. Ann Thorac Surg., 1990;50:136-137.
28. Saad R. M. et al. Progressive Hemolytic Anemia due to Delayed Recognition of a Beall Mitral Valve Prosthesis. Chest., 1991;99:496-498.
29. López Valle H. et al. Valvulas Cardíacas (Estudio Anatomicopatológico de 1139 casos). Arch Inst Cardiol

- Mex., 1991;61:197-203.
30. Castilla R. et al. Evolución post-operatoria en el recambio valvular protésico. Arch Inst Cardiol Mex., 1991;61:251-255.
31. Smith R. E. et al. Occult paravalvular leak in a clinically normal St. Jude's mitral valve presenting with life-threatening microangiopathic hemolytic anemia. J Cardiovasc Surg., 1991;32:56-58.
32. Philip H. Techniques in Extracorporeal Circulation, Ed. Butterworth Heinemann, Grain Britain, 1992.
33. Kloster F. E. et al. Complications of Artificial Heart Valves. JAMA., 1979;241:2201-2203.
34. Byrd S. Hematología clínica, 4a ed, Ed. Interamericana, México, 1976.
35. Koepke J. A. Análisis de Laboratorio Clínico para el Diagnóstico, Ed. Limusa, México, 1983.
36. Gradwohlps, Clinical Laboratory Methods and Diagnostics, 7a ed, Ed. The C.V. Mosby Company, E.U.A., 1970.

37. Saénz G. P. y col., Laboratorio y Hemoglobiopatías,
Universidad de Costa Rica, Costa Rica, 1980.
38. Todd S., Diagnóstico Clínico, 15a ed,
Ed. W.B. Saunders company, 1974, U.S.A.
39. Sánchez R. M., Manual de Prácticas de Laboratorio de
análisis Bioquímicos Clínicos II,
U.N.A.M., México, 1988.
40. Piña F. L., Obtención de Muestras Sanguíneas de calidad
analítica,
Laboratorio de Diagnóstico Clínico de Tuxtla Gutiérrez
S.A. de C.V., Chiapas, 1993.
41. Krupp Marcus A., Manual de Diagnóstico Clínico de
Laboratorio,
Ed. Manual Moderno S.A. de C.V., México, 1986.

Figura 6. Equipo Automátizado Celldyn 3000

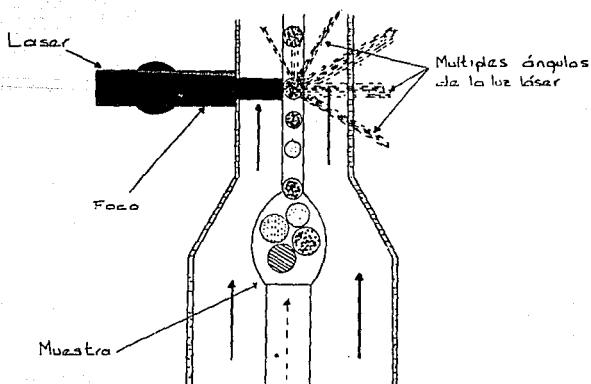
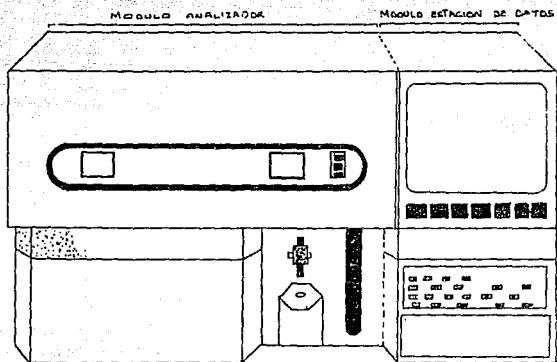


Figura 7. Equipo Automatizado Express 550

