

12
2eje



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**



**"ESTANDARIZACION Y MONTAJE DE PRUEBAS BASICAS Y
ESPECIFICAS EN EL DIAGNOSTICO DE ANEMIAS
HEMOLITICAS."**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A N
MARIA CRUZITA DOMINGUEZ RIVERO
EDITH HERNANDEZ DOMINGUEZ
ARACELI VERGARA CABALLERO

ASESOR: O.F.B. IDALIA AVILA MIYAZAWA

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1994



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
SECRETARIA ACADEMICA
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de
Exámenes Profesionales

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

AT'N: ING. RAFAEL RODRIGUEZ CEBALLOS,
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

Estandarización y Montaje de Pruebas Básicas y Específicas
en el Diagnóstico de Anemias Hemolíticas.

que presenta la pasante: María Cruzita Domínguez Rivero.

con número de cuenta: 8754134-8 para obtener el TITULO de:
Química Farmacéutica Bióloga ; en colaboración con :
Edith Hernández Domínguez y Araceli Vergara Caballero

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuatitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 24 de Marzo de 1994

PRESIDENTE	C.P.B. Ramón Gedejas Ramírez	
VOCAL	C.P.B. Idalia Avila Miyazawa	
SECRETARIO	C.P.B. Antonio Sánchez Ortega	
PRIMER SUPLENTE	C.P.B. Rene Damián Santos	
SEGUNDO SUPLENTE	C.P.B. Patricia Campos Peón	



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
SECRETARIA ACADEMICA
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de
Exámenes Profesionales

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

AT'N: ING. RAFAEL RODRIGUEZ CEBALLOS,
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

Estandarización y Montaje de Pruebas Básicas y Específicas en el Diagnóstico de Anemias Hemolíticas.

que presenta la pasante: Edith Hernández Domínguez,
con número de cuenta: 0857343-0 para obtener el TITULO de:
Química Farmacéutica Bióloga ; en colaboración con :
María Cruzita Domínguez Rivero y Araceli Vergara Cebalero.

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx.. a 24 de Marzo de 1964

PRESIDENTE	<u>C.P.R. Ramón González Ramírez</u>	
VOCAL	<u>C.P.R. Idalia Avila Miyazawa</u>	
SECRETARIO	<u>C.P.R. Antonio Sánchez Ortega</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>C.P.R. Rene Domián Santos</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>C.P.R. Patricia Campos León</u>	



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVANZA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN U. N. A. M.
SECRETARIA ACADÉMICA
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de
Exámenes Profesionales

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

AT+N: ING. RAFAEL RODRIGUEZ CEBALLOS.
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

Estandarización y Montaje de Pruebas Básicas y Específicas en el Diagnóstico de Anemias Hemolíticas.

que presenta la pasante: Araceli Vergara Caballero,
con número de cuenta: 8857310-0 para obtener el TITULO de:
Química Farmacéutica Bióloga ; en colaboración con :
María Cruzita Domínguez Rivero y Edith Hernández Domínguez.

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 24 de Marzo de 1964

PRESIDENTE	<u>Q.F.B. Ramón Cendejas Ramírez</u>	
VOCAL	<u>Q.F.B. Idalis Avila Miyazawa</u>	
SECRETARIO	<u>Q.B.P. Antonio Sánchez Ortega</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>Q.F.B. Rene Damián Santos</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>Q.F.B. Patricia Campos Peón</u>	

Este trabajo fué realizado en la Sección de Análisis Clínicos y Patología de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. bajo la dirección de la Q.F.B. Idalia Avila Miyazawa.

...A quien nos ama profundamente y que en cada momento y circunstancia de nuestra vida nos va llenando de lo que nuestras almas necesitan para vivir mejor: Fe y Amor y quien tiene el poder de transformar el dolor de la desesperación en el gozo de la esperanza...

A Dios por permitirnos llegar a esta etapa de nuestra vida profesional.

AGRADECEMOS A:

A la Q.F.B. Idalia Avila Miyazawa.

Con admiración y respeto al reconocerle como ejemplo de calidad humana por sus conocimientos compartidos, sus valiosos consejos y ayuda incondicional en la dirección y realización de esta tesis.

Al Q.F.B. Ramón Cedejas Ramírez.

Por su valiosa e incondicional colaboración durante el trayecto de esta tesis.

Al Jurado nombrado en el examen Profesional, a quienes agradecemos todas las recomendaciones realizadas para la presentación de esta Tesis.

M. en C. Susana Mendoza Elvira.

Dr. José González Llaven.

Q. Josefa de la Piedra.

Q.F.B. Leticia Arellano.

C. Ma. de la Luz Ramírez (encargada del Lab. ABC).

Nuestro más sincero agradecimiento por su inapreciable apoyo.

A todos los profesores de la FES-Cuautitlán quienes nos enriquecieron con sus conocimientos a través de los cuales logramos llegar al final y a la UNAM fuente de conocimientos.

Sería difícil agradecer a cada una de todas las personas que de una u otra forma han contribuido a la realización de esta tesis: Alumnos de ABC I Generaciones 17^{ava} y 18^{ava} de Q.F.B.
GRACIAS.

A mi Madre y a la Memoria de mi Padre:

Efigenia y Filemón†

A quienes debo inmensa gratitud, por el apoyo que siempre me brindaron y la confianza que depositaron en mí, por su amor, esfuerzo y comprensión incondicional logrando labrar en mi el espíritu de la Superación, alentándome a terminar mi carrera que es para mi la mejor de las herencias.

Papá. Siempre llevaré tu recuerdo en mi mente y en mi corazón.
Te dedico esta tesis como fruto de tus consejos,
sacrificios y desvelos. Eternamente Gracias.

A mis hermanos

Tere

Lety

Benja.

Y a la memoria de mi hermano Toño.

A mis compañeras de Tesis:

Crucita y Edith.

Porque me llenaron del espíritu del Optimismo.

Porque juntas convivimos experiencias gratas, de las cuales aprendimos y nos enriquecieron para la práctica profesional futura.

Porque logramos vencer y afrontar obstáculos a lo largo del camino llegando al término.

Por esa fuerza de superación que día a día alimentaba nuestro espíritu, más que mis compañeras, mis AMIGAS gracias por su comprensión.

A todas aquellas personas que en cierta forma me impulsaron a continuar mis estudios y terminar esta TESIS.

Quien los quiere y estima.

ARACELI VERGARA CABALLERO

Quiero a través de DIOS agradecer a TODOS aquellos que iluminaron mi camino con su luz, hasta que descubrí la propia. Y... a través de ellos, dar las GRACIAS a DIOS por manifestarme siempre su presencia y abrir mi mente para conocerla.

A mis padres: Félix y Hermelinda.

Por darme la vida y su cariño. Porque supieron enseñarme la alegría del Trabajo, porque la semilla que un día sembraron es ahora una planta que comienza a dar frutos y este trabajo es uno de ellos, por ser el motivo de mi lucha, por darme la oportunidad de ser alguien en la vida, lo cual constituye la herencia más valiosa que pudiera recibir para continuar con mi superación.

A mis hermanos: Alejandro, Reyna, Félix, Guadalupe, Manuel y Araceli.

Porque son parte invaluable de mi existir, por su cariño, su apoyo y "pleitos" que sirvieron para unir los lazos de hermandad.

A mis sobrinas: Nallely, Karina y Fernanda.

Por sus sinceras y eternas sonrisas.

A mis Amigas: Eva, Estela, Ma. Elena, Rocío e Ino.

Porque me enseñaron que la AMISTAD no tiene precio, por creer en mí y aceptarme como soy, por su cariño y los bellos momentos que hemos compartido siempre.

Porque Uds. constituyen una parte de mi vida como ser humano y estudiante: "Vale más tener AMIGOS que dinero".:Irene, Marisa, Elisa, Petardo, Chiquilin, Jorge, Doc, Gus... y todos aquellos con los que tuve algo que compartir.

A Edith y Araceli:

Gracias por su compañerismo y Amistad, por el empeño y esfuerzo, por todos los momentos que vivimos desde el inicio hasta el final de la Tesis, porque todo es para recordarse y porque todo fin tiene un principio...
porque encontremos lo que buscamos...

Con Sincero Cariño
María Crucita

A Dios de quien proviene toda sabiduría
te doy gracias por darme la oportunidad de vivir,
por haberme dado la energía necesaria para alcanzar mis metas;
por ayudarme a mantenerme siempre firme en
mis éxitos y en mis fracasos, a tí
a quien tengo mucho que agradecer y poco que pedir.

A mis padres: Juvenal Hernández y María del Socorro Domínguez,
por darme la existencia, por el apoyo incondicional que me
brindaron en cada uno de los momentos importantes de mi vida,
así como su confianza e innumerables esfuerzos depositados en
mí para realizar una de mis más grandes metas: mi formación
profesional la cual constituye la herencia más grande que
pudiera recibir.

A mis compañeras: María Crucita Domínguez y Araceli Vergara,
por la ayuda, paciencia, comprensión y amistad que dedicaron
durante la realización de esta tesis, quiero darles las
gracias sinceramente, lo logramos y claro con tan
extraordinarias amigas.

Toda obra grande o pequeña, importante o leve,
constituye la huella del paso de un hombre sobre la tierra.
Este rastro podrá ser imperecedero o efímero,
pero siempre es trascendente, construir una obra
significa dar a los demás un poco de quien lo fabrica,
dar un poco de uno mismo.

Con respeto y cariño.

Edith Hernández Domínguez.

ABREVIATURAS

Acido-Citrato-Dextrosa	ACD
Acido Ribonucleico	RNA
Acido Ribonucleico Heteronuclear	RNAHn
Acido Ribonucleico Mensajero	RNAM
Adenosin Trifosfato	ATP
Aminoácido	aa
Anemia Hemolítica	AH
Anemia Hemolítica Autoinmune	AHAI
Anemia Hemolítica Isoinmune	AHI
Anticuerpo	Ac
Antígeno	Ag
Carboxihemoglobina	COHb
Complejo de Ataque a la Membrana	CAM
Complemento	C'
Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media	CHCM
Crioaglutininas	CA
Cromo 51	⁵¹ Cr
Curva de Calibración	CC
Densidad Optica	DO
2,3-Difosfoglicerato	2,3-DPG
Dinucleótido de Nicotinamida-Adenina reducido	NADH
Dióxido de carbono	CO ₂
Enfermedad de Hemaglutininas Frías	EHF
Enfermedad Hemolítica del Recién Nacido	EHRN
Error de Estimación	Ee
Esferocitosis Hereditaria	EH
Factor de Aceleración de Desintegración	FAD
Fosfoenol Piruvato	PEP
3-Fosfoglicerato	3-PG
Fragmento cristalizabile	Fc
Glucosa-fosfato deshidrogenasa	G-PD

Glutati3n Reducido	GSH
Grado cent3grado	°C
Haptoglobina	Hp
Haptoglobina-Hemoglobina	Hp-Hb
Hematocrito	Hto
Hemoglobina	Hb
Hemoglobina A	HbA
Hemoglobina C	HbC
Hemoglobina Corpuscular Media	HCM
Hemoglobina D	HbD
Hemoglobina E	HbE
Hemoglobina Fetal	HbF
Hemoglobina S	HbS
Hemoglobinuria Paroxística a Frigore	HPF
Hemoglobinuria Paroxística Nocturna	HPN
Hem3lisis Extravascular	HE
Hem3lisis Intravascular	HI
Hemopexina	Hx
Hemosiderina	Hs
Hexosa Monofosfato	HMP
Hierro	Fe
Indice de Reticulocitos	IR
Indices de Wintrobe	IW
Inhibidor de la Lisis Reactiva de Membrana	ILRM
Inmunodifusi3n Radial Simple	IDRS
Inmunoglobulina G	IgG
Inmunoglobulina M	IgM
I3n cromato	⁵¹ CrO ₄
I3n f3rrico	Fe ³⁺
I3n ferroso	Fe ²⁺
Isoelectroenfoque	IEF
Lactato Deshidrogenasa	LDH
Litro	L
Metahemalb3mina	Mha

Metahemoglobina	MetaHb
Micras cúbicas	μ^3
Microlitros	μl
Micromoles	μM
Mililitros	ml
Milímetros	mm
Milímetros cúbicos	mm^3
Milimoles	mM
Monóxido de carbono	CO
Nanómetros	nm
Nucleótido de piridina	(TPN ó NADP)
Oxígeno	O ₂
Paquete Celular del Paciente	PCP
Paquete Celular Normal	PCN
Persistencia Hereditaria de la Hemoglobina Fetal	PHHF
Peso Molecular	PM
Picogramos	Pg
Piruvato Cinasa	PC
Porcentaje	%
Potasio	K ⁺
Productos de la degradación de la fibrina	PDF
Prueba de antiglobulina Directa	PAD
Prueba de antiglobulina Indirecta	PAI
Punto Isoeléctrico	PI
Reacción Hemolítica Transfuncional Tardía	RHTT
Reactivo analítico	r.a.
Relación Eritropoyetina/Maduración de la Médula Osea	E/M
Revoluciones por minuto	rpm
Sistema Reticulo Endotelial	SRE
Sodio	Na ⁺
Solución	Soln
Solución Isotónica de Sacarosa	SIS
Solución Salina Fisiológica	SSF
Suero Sanguíneo Fresco del Control Normal	SsFCN

Suero Sanguíneo Fresco del Control Normal Inactivado	SsFCNI
Suero Sanguíneo Fresco del Paciente	SsFP
Sulfahemoglobina	SulfaHB
Sulfhidrilo	SH
Suspensión de Hematíes del Control Normal	SHCN
Suspensión de Hematíes del Paciente	SHP
Talasemia	Tal
Unidades Internacionales	UI
Velocidad Máxima	Vmáx
Volumen Corpuscular Medio	VCM

INDICE DE TABLAS Y CUADROS

Hoja

CAP. II

Tabla 2-1. Propiedades fisicoquímicas del hematie [47].....	3
Tabla 2-2. Características fenotípicas y reacciones de aglutinación del sistema ABO [41].....	15
Tabla 2-3. Propiedades de las inmunoglobulinas [30].....	16
Tabla 2-4. Clasificación etiológica de las anemias hemolíticas [66].....	28

CAP. IV

Tabla 4-1. Clasificación morfológica de las anemias en función de los IW [34].....	44
Tabla 4-2. Relación del hematocrito corregido, % de reticulocitos e IR.	51
Tabla 4-3. Respuesta del IR frente a una hemorragia aguda [99].....	53
Tabla 4-4. Pruebas de laboratorio usadas en el diagnóstico de AH.....	54
Tabla 4-5. Detecciones externas usando Cr ⁵¹ . Principales hallazgos en las Anemias Hemolíticas [99].....	57
Tabla 4-6. Clasificación de las Anemias Hemolíticas Inmunes.....	76
Tabla 4-7. Clasificación de las deficiencias erzimáticas [18].....	120
Tabla 4-8. Hemoglobinas normales presentes en el adulto [34, 69, 72].....	130
Tabla 4-9. Principales cuadros drepanocíticos [72].....	134
Tabla 4-10. Hemoglobinas Inestables.....	139
Tabla 4-11. Velocidades electroforéticas relativas de las diversas hemoglobinas en diferentes condiciones [84].....	148

CAP. V

Tabla 5-1.	Características de la población estudiada.....	168
Cuadro 5-1.	Comparación de la \bar{X} experimental en función de la \bar{X} de referencia para las pruebas básicas en muestras normales.....	169
Cuadro 5-2.	Comparación de la \bar{X} experimental en función de la \bar{X} de referencia para las pruebas básicas en 35 muestras normales.....	170
Cuadro 5-3.	Comparación de la \bar{X} experimental en función de la \bar{X} de referencia para las pruebas específicas en 35 muestras normales.....	171
Cuadro 5-4.	Resultados estadísticos (\bar{X} , S y C.V.) de las pruebas básicas en muestras normales.....	172
Cuadro 5-5.	Resultados estadísticos (I.C., Ee, Pruebas de hipótesis) de las pruebas básicas en muestras normales.....	173
Cuadro 5-6.	Resultados estadísticos (I.C., Ee, Pruebas de hipótesis) de las pruebas básicas en muestras normales.....	174
Cuadro 5-7.	Resultados estadísticos (\bar{X} , S y C.V.) de las pruebas básicas en 35 muestras normales.....	175
Cuadro 5-8.	Resultados estadísticos (I.C., Ee, Pruebas de hipótesis) de las pruebas básicas en muestras normales.....	176
Cuadro 5-9.	Resultados estadísticos (\bar{X} , S y C.V.) de las pruebas específicas en 35 muestras normales.....	177
Cuadro 5-10.	Resultados estadísticos (I.C., Ee, Pruebas de hipótesis) de las pruebas específicas en 35 muestras normales.....	178
Cuadro 5-11.	Resultados obtenidos para las pruebas específicas cualitativas en 35 muestras normales.....	179

INDICE DE FIGURAS Y GRAFICAS

Hoja

CAP. II

Fig. 2-1. Jerarquía de las células madre hematopoyéticas....	5
Fig. 2-2. Representación esquemática de la estructura del esqueleto de la membrana del hematíe [31, 47, 65, 66, 72].....	6
Fig. 2-3. Metabolismo de la glucosa en el hematíe. Se muestran vías metabólicas en el hematíe para obtener energía a partir de la glucosa.....	7
Fig. 2-4. Núcleo de porfirina de hierro. Existen 4 de estos grupos heme en cada molécula de hemoglobina, unidos a la proteína globina [56].....	10
Fig. 2-5. Metabolismo de la hemoglobina: Origen y formación de la bilirrubina.	11
Fig. 2-6. La diferencia entre un aglutinógeno A y un aglutinógeno B esta dada por la adición de la N-acetilgalactosamina (GalNAc) y galactosa (Gal) a la galactosa subterminal, confiriendo la actividad A y B respectivamente. GlcNAc = N-Acetilglucosamina, Fuc = Fucosa. [2].....	14
Fig. 2-7. Presentación esquemática de la medición del potencial zeta en los hematíes.....	17
Fig. 2-8. Hemólisis Extravascular. Principal vía de destrucción de los hematíes y degradación de hemoglobina por el sistema reticuloendotelial corresponde a un 90% de la destrucción diaria normal [47].....	23
Fig. 2-9. Hemólisis Intravascular. Vía de transporte de la hemoglobina como resultado de la destrucción de los hematíes en los vasos sanguíneos. Corresponde a un 10% de la desintegración diaria normal, dentro del sistema vascular [47].....	25

CAP. IV.

Fig. 4-1.	Observación del hematíe normal y anomalías físicas.....	48
Fig. 4-2.	Técnica de la cinética del hematíe mediante marcado de los hematíes con cromo radiactivo, mediciones de reactividad de estos hematíes y detecciones externas [18].....	56
Fig. 4-3.	Curva de calibración para las haptoglobinas.....	61
Fig. 4-4.	Representación esquemática de Inmunodifusión Radial [76].....	64
Fig. 4-5.	Enfermedad Hemolítica del Recién Nacido [69].....	79
Fig. 4-6.	Mecanismo de absorción de fármacos [69].....	84
Fig. 4-7.	Mecanismo por complejos inmunes [69].....	85
Fig. 4-8.	Mecanismo por modificación de la membrana [69]... ..	86
Fig. 4-9.	Representación esquemática de la prueba de aglutinación directa.....	87
Fig. 4-10.	Representación esquemática de la prueba de aglutinación indirecta.....	91
Fig. 4-11.	Fragilidad osmótica de los hematíes. a: talasemia, b: zona normal y c: esferocitosis hereditaria [32].....	111
Fig. 4-12.	Efecto de la incubación sobre la fragilidad osmótica en los hematíes.....	112
Fig. 4-13.	Síntesis de cadenas de globina prenatal y postnatal [69].....	130
Fig. 4-14.	Imagen característica de una separación de hemoglobina mediante isoelectroenfoque horizontal en unidades frías [94].....	152
Gráfica 5-1	Curva de calibración para la determinación de haptoglobina sérica.....	180
Gráfica 5-2	Fragilidad osmótica en los hematíes de 35 muestras normales a las 0 horas y después de incubación a 37°C/24 horas.....	181

INDICE

	Hoja
I.- INTRODUCCION	1
II.- GENERALIDADES	3
2.1. EL HEMATIE	3
2.1.1. La Membrana del Hematie.....	3
2.1.2. Metabolismo del Hematie.....	4
2.1.2.1. Vías Auxiliares en la Glucólisis.	8
2.1.3. Hemoglobina.	8
2.1.3.1. Metabolismo de la Hemoglobina.	9
2.1.4. Inmunoematología del Hematie.	10
2.1.4.1. Antígenos de los Hematies.	11
2.1.4.2. Anticuerpos Frente a los Hematies.	15
2.1.5. Desequilibrio del Hematie.	20
2.1.5.1. Hemólisis Extravascular.	22
2.1.5.2. Hemólisis Intravascular.	24
2.1.6. Clasificación de los Trastornos Hemolíticos.	27
2.1.6.1. Clasificación Etiológica de las Anemias Hemolíticas.	28
III.- OBJETIVOS	36
IV.- MATERIAL Y METODOS	37
4.1. PRUEBAS BASICAS	37
4.1.1. Hemograma de la Fórmula Roja.	37
4.1.1.1. Recuento de Hematies.	37
4.1.1.2. Determinación de Hemoglobina.	39
4.1.1.3. Determinación de Hematocrito.	41
4.1.1.4. Determinación de los Indices de Wintrobe.	43

4.1.2. Valoración y Estudio de la Extensión Sanguínea. . .	45
4.1.3. Recuento de Reticulocitos.	49
4.1.4. Índice Reticulocitario.	51
4.2. PRUEBAS ESPECIFICAS	53
4.2.1. Pruebas para Determinar Hemólisis.	55
4.2.1.1. Supervivencia del Hematíe a $^{51}\text{CrO}_4\text{Na}$	55
4.2.1.2. Determinación de Haptoglobina Sérica.	58
4.2.1.3. Determinación de Hemopexina Plasmática.	62
4.2.2. Pruebas para Determinar Hemólisis Intravascular... 65	65
4.2.2.1. Determinación de Hemoglobina en el Plasma. ...	65
4.2.2.2. Determinación de Metahemalbúmina del Plasma. .	68
4.2.2.3. Determinación de Hemoglobina en Orina.	70
4.2.2.4. Determinación de Hemosiderina en Orina.	73
4.2.3. Pruebas para Determinar Enfermedad Hemolítica	
Inmune.	76
4.2.3.1. Anemias Hemolíticas Inmunes.	76
4.2.3.1.1. Anemias Hemolíticas Isoinmunes.	77
4.2.3.1.2. Anemias Hemolíticas Autoinmunes.	80
4.2.3.1.3. Anemias Hemolíticas Inmunes Inducidas por Drogas.	84
4.2.3.2. Prueba de Antiglobulinas de Coombs.	86
4.2.3.2.1. Prueba Directa de Coombs.	86
4.2.3.2.2. Prueba Indirecta de Coombs.	90
4.2.3.3. Determinación del Título de Aglutininas Frías. 94	94
4.2.4. Pruebas para Determinar la Presencia de Hemoglobinuria Paroxística Nocturna.	98
4.2.4.1. Prueba de Hemólisis a la Sacarosa.	99
4.2.4.2. Prueba de Hemólisis Acida de Ham.	102
4.2.5. Pruebas para Determinar Esferocitosis Hereditaria. 106	106
4.2.5.1. Prueba de Fragilidad Osmótica.	107
4.2.5.2. Prueba de Autohemólisis.	113

4.2.6. Pruebas para Determinar Deficiencias Enzimáticas del Hematíe.	117
4.2.6.1. Deficiencia de Piruvato Cinasa.	119
4.2.6.2. Deficiencia de Glucosa-6-Fosfato Deshidrogenasa.	124
4.2.6.2.1 Prueba de los Cuerpos de Heinz para Células Deficientes de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-PD).	127
4.2.7. Pruebas para Determinar Hemoglobinopatías.	129
4.2.7.1. Hemoglobinopatías Estructurales.	133
4.2.7.2. Talasemias.	140
4.2.7.3. Electroforesis de Hemoglobinas.	146
4.2.7.4. Prueba de Detección Seriada para Hemoglobina Falciforme.	153
4.2.7.5. Prueba de Desnaturalización por Alkali.	157
4.2.7.6. Prueba de Estabilidad al Calor.	160
4.2.7.6.1. Método Microscópico de los Cuerpos de Heinz en Hemoglobinas Inestables.	163
4.2.7.7. Prueba de Solubilidad para Hemoglobinas.	165
V.- RESULTADOS	167
VI.- DISCUSION	182
VII.- CONCLUSIONES	185
VIII.- ANEXOS	186
ANEXO 1	186
ANEXO 2	194
IX.- REFERENCIAS	196

I.- INTRODUCCION

El fin de este estudio es para entender la patofisiología de las diversas Anemias Hemolíticas (AH), las cuales tienen sus propias características que marcan sus diferencias como enfermedad en este amplio grupo. Es importante hacer referencia a los trastornos hemolíticos cuya importancia radica no sólo en conocer su patogenia, manifestaciones clínicas y su tratamiento, sino en prevenir y controlar tales defectos, determinando el tipo de hemólisis presente en un estado hemolítico evitando así mayores manifestaciones que puedan ser fatales. Tal es el caso de las Talasemias, las cuales constituyen un grupo de desórdenes heterogéneos que están caracterizados por la síntesis defectuosa de una u otra cadena de globina de la hemoglobina, lo que provoca una significativa morbilidad y mortalidad en grandes segmentos de la población mundial [1, 37, 45, 51, 99].

Otros trastornos de importancia son la Esferocitosis Hereditaria (EH), deficiencias eritroenzimáticas (Piruvato Cinasa y Glucosa-6-Fosfato Deshidrogenasa), entre otras, las cuales se asocian a las Talasemias por un defecto de la proteína 4.1 del citoesqueleto de la membrana del hematíe, la cual determina la morfología del hematíe así como la estabilidad mecánica de la membrana [12, 13, 19, 20, 31].

Otro grupo importante son las Anemias Hemolíticas Inmunes (AHI) en las cuales los individuos se ven afectados por la formación de: Autoanticuerpos contra sus propios hematíes; destruyéndolos, los cuales reaccionan cuando se exponen a algún contacto físico, químico o alguna otra causa; e isoanticuerpos los cuales reaccionan con hematíes de la misma especie, tal es el caso de las reacciones de transfusión sanguínea y la Anemia Hemolítica del Recién Nacido (con un índice elevado de mortalidad en ésta última).

La frecuencia de las Anemias Hemolíticas en cada país depende de varios factores como son: la evaluación correcta de la enfermedad, su determinación a tiempo y sobre todo la variabilidad biológica de cada individuo ante ésta. Además de su variada etiología, las Anemias Hemolíticas constituyen un grupo de enfermedades que repercuten de alguna manera en la economía nacional de los países afectados, por lo tanto su estudio abarca una serie de procesos clínicos (Médico-Laboratorio) que ayudan a

evaluar a un paciente hemolítico, considerando que cada tipo de enfermedad comprende características clínicas y hallazgos de laboratorio que son determinantes en el diagnóstico correcto [2,10,32].

Por las razones anteriores, hemos elegido a las Anemias Hemolíticas por ser éstas de significativa importancia clínica, pretendiendo que dentro del área de Análisis Clínicos de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FES-C) se lleve a la práctica una estrategia para evaluar a un paciente en el área hematológica, no sólo apoyándose en el hemograma primario, sino complementando el estudio con pruebas específicas para llegar al diagnóstico preciso y confiable. Debido a que muchas veces los Análisis Primarios son indicadores del estado general de salud del individuo, no podemos deducir el tipo de anemia basándonos en una baja concentración de hemoglobina o en la cifra total de hematíes ya que es importante considerar que tal definición comprende diversos tipos, ej. anemia ferropénica, megaloblástica, hemolítica entre otras, por lo cual es necesario mediante pruebas básicas y específicas determinar el tipo de anemia presente y así elegir el tratamiento apropiado. Asimismo, la razón por la cual hemos elegido este tema de estudio ha sido para contribuir como material de consulta a estudiantes y profesionistas relacionados con el Area de la Salud, con el propósito de servir como una guía de utilidad en su desarrollo profesional.

Este trabajo contiene una serie de Pruebas Básicas y Específicas montadas y estandarizadas en base al material y equipo existentes en el Laboratorio de Análisis Clínicos y Patología de la Facultad, las cuales contienen: Introducción, Fundamentos, Método, Valores de Referencia e Interpretación, con la finalidad de reunir información teórica y experimental para un mejor aprendizaje y comprensión de las Anemias Hemolíticas incluidas en esta TESIS.

II.- GENERALIDADES

2.1. EL HEMATIE

Los hematíes normales son producidos en la médula ósea por la maduración de los normoblastos tardíos los que a su vez se derivan de células jóvenes (Fig. 2-1). Algunas propiedades fisicoquímicas del hematíe maduro se describen en la tabla 2.1 [47, 69, 99].

Tabla 2-1. Propiedades Fisicoquímicas del hematíe [47].

A) Hematíe individual.

- a) Diámetro: 7.4 a 8.2 μm .
- b) Grosor (disco bicóncavo): 1.5 a 1.8 μm
- c) Area superficial: 130 a 150 μm^2
- d) Volumen: 85 a 95 fl
- e) Masa: 90 a 100 ng.
- f) Contenido de hemoglobina: 27 a 31 pg

B) Hematíe desplazado.

- a) Velocidad de producción: 2.5 millones/seg.
200 billones/seg.
- b) Vida media: 110 a 130 días.
- c) Hematíes en circulación:

	HOMBRES	MUJERES
Densidad sanguínea (millón/ μl)	4.0 a 6,2	4.0 a 5.5
Volumen total hemático (ml/Kg)	25 a 31	22 a 28
Hemoglobina (g/dl)	14 a 18	12 a 16
Hematocrito (%)	47 a 55	42 a 48

2.1.1. La membrana del hematíe.

La membrana del hematíe está compuesta por lípidos, dispuestos en una doble capa, y proteínas, algunas de las cuales se encuentran unidas en la doble capa de lípidos o bien la atraviesan, y otras se adhieren a la superficie citoplasmática de dicha capa, además cuenta con un dispositivo metabólico con la misión de conservar la hemoglobina en un estado funcional. Esta red proteinéica se denomina esqueleto de la membrana y está

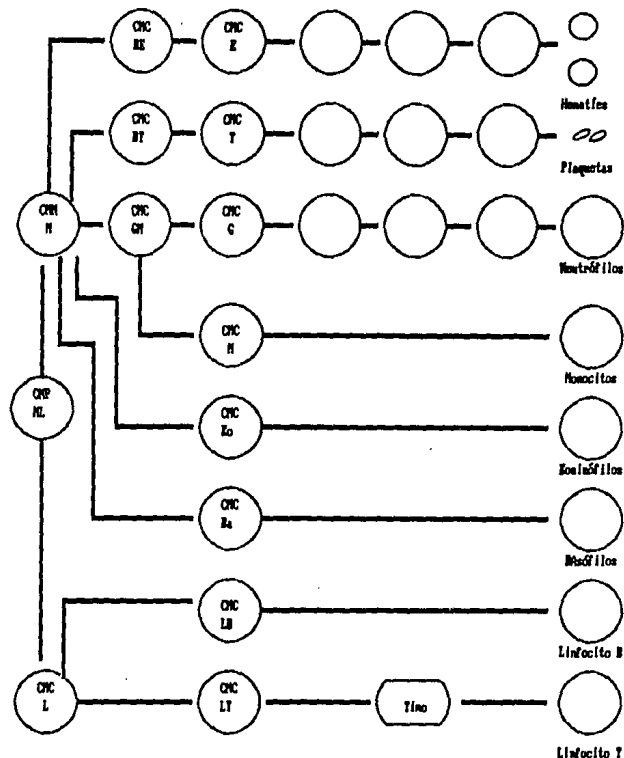
compuesta de dos partes interactivas:

- 1) Una porción externa formada por la doble capa de lípidos y por las proteínas hundidas en ésta.
- 2) La porción interna formando el esqueleto de la membrana, en donde se encuentran las principales proteínas del esqueleto de la membrana: espectrina, actina, banda 4.1 y banda 4.9. Una quinta proteína, anquirina, a pesar de no constituir estrictamente un componente del esqueleto de la membrana, sirve para unir dicho esqueleto a la doble capa de la membrana (Fig. 2-2) [31, 47, 60, 69, 72, 93, 99].

2.1.2 Metabolismo del hematíe.

El metabolismo del hematíe no nucleado está más limitado que el de la mayoría de las células del cuerpo, ya que hay poca capacidad para metabolizar los ácidos grasos y los aminoácidos (aa) y no hay mitocondrias para el metabolismo oxidativo. La energía se genera casi exclusivamente a través de la descomposición de la glucosa. El patrón global de la glucólisis del hematíe se muestra en la Fig. 2-3, el metabolismo del hematíe puede subdividirse en la vía anaeróbica o de Embden-Meyerhof y las 3 vías auxiliares que actúan de diferentes maneras para mantener la función de la hemoglobina. Todos estos procesos son esenciales para que el hematíe transporte oxígeno (O₂) y para mantener aquellas características físicas requeridas para su supervivencia en la circulación.

La vía de Embden-Meyerhof es responsable de aproximadamente 90% de la utilización de la glucosa por el hematíe y proporciona la energía esencial para el mantenimiento de la membrana. En la descomposición de una molécula de glucosa a lactato, se consumen dos moléculas de adenosín trifosfato (ATP) durante la porción hexosa de la vía, pero se generan de 3 a 4 moléculas a nivel de la triosa. Es esta ganancia neta en ATP la que proporciona fosfato de alta energía para el mantenimiento de la forma de disco y la flexibilidad del hematíe para el mantenimiento de los



CNC Célula Madre Comprometida.
 CMP Célula Madre Primitiva.
 CMM Célula Madre Multipotencial.
 CNC-Bast (CNC-B).
 ML Mielolinfoide.
 L Linfocito.
 LB Linfocito B.
 LT Linfocito T.

H Mielocito.
 GN Granulocítica.
 G Granulocítica.
 H Monocito.
 Eo Eosinófilo.
 Ee Macrófago.
 E Eritrocito.
 Y Trombopoyética.

Fig 2-1. Jerarquía de la célula madre hematopoyética.

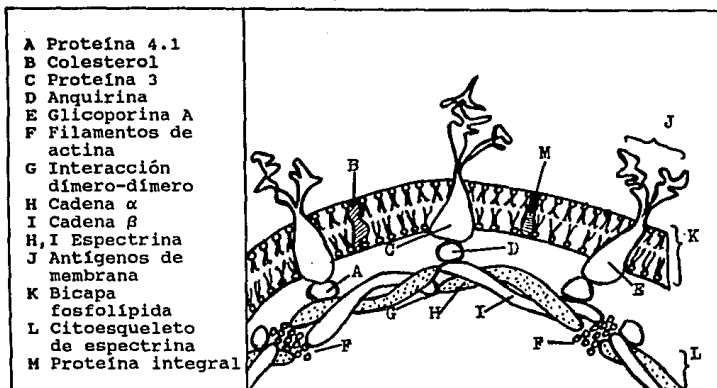


Fig. 2-2- Representación esquemática de la estructura del esqueleto de la membrana del hematíe [31, 47, 65, 66, 72].

lípidos de la membrana, y para proporcionar energía a las bombas metabólicas que controlan el flujo de sodio y potasio. El papel esencial del ATP en el hematíe está demostrado por lo menos en dos condiciones: (1) la muerte celular temprana (Anemia Hemolítica, AH) que ocurre cuando el ATP es deficiente debido a defectos hereditarios en la glucólisis, y (2) la pérdida de viabilidad que acompaña a la degradación del ATP de la sangre conservada in vitro.

La vía Embden-Meyerhof también mantiene los nucleótidos de piridina en un estado de reducción para permitir su función en la homeostasis oxidativa-reductora dentro de la célula [28, 38, 47, 93].

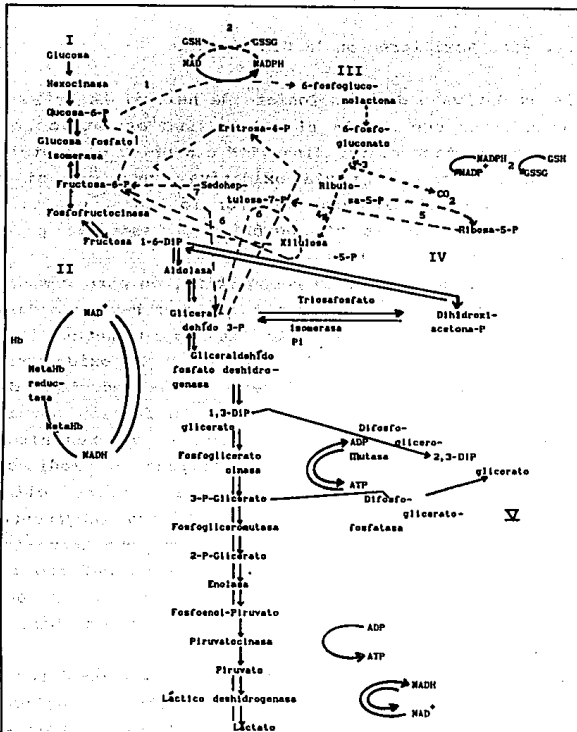


Fig. 2-3. Metabolismo de la glucosa en el hematíe. Se muestran las vías metabólicas en el hematíe para obtener energía a partir de la glucosa.

- I) Vía de Embden-Meyerhof.
- II) Vía de metahemoglobina reductasa.
- III) Vía de atajo de las pentosas.
- IV) Vía metabólica del monofosfato de hexosa.
- V) Vía Luebering Rappaport.

Enzimas que intervienen en la vía del monofosfato de hexosa:

- 1) Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.
- 2) Glutación reductasa.
- 3) Fosfogluconato deshidrogenasa.
- 4) Ribulosa fosfato epimerasa.
- 5) Ribosa fosfato isomerasa.
- 6) Transquelotasa.
- 7) Transaldolasa. [99]

2.1.2.1. Vías Auxiliares en la Glucólisis.

1) Vía oxidativa o del monofosfato de hexosa. Es un sistema de energía auxiliar que acopla el metabolismo oxidativo con la reducción del nucleótido de piridina (TPN ó NADP) y el glutatión. Un defecto enzimático en la vía oxidativa puede por sí sólo causar una Anemia Hemolítica crónica. Por lo tanto, es evidente que cierta actividad en la vía aeróbica es esencial para la supervivencia del hematíe normal.

2) Vía de la reductasa de la hemoglobina, es otro componente importante del metabolismo del hematíe así como hay un mecanismo para proteger la hemoglobina (Hb) de la desnaturalización oxidativa, también hay necesidad de prevenir la oxidación del hierro del heme. Una deficiencia latente de la reductasa de la metahemoglobina (MetaHb) es compatible con la función normal de la Hb en condiciones basales pero resultará en valores altos de MetaHb cuando se le administre al individuo un medicamento oxidante (fenilhidrazina). Sin embargo, los datos clínicos habitualmente dependen de un defecto metabólico subyacente, y cualquier individuo determinado tendrá solamente una anomalía. Ya sea que haya una Anemia Hemolítica debida a un defecto en el metabolismo aerobio o cianosis debida a trastornos de la reducción de la MetaHb de la formación de sulfahemoglobina o de ambas [28, 38, 47, 93].

3) Vía de Luebering-Rapaport, desvía la formación directa de 3-fosfoglicerato (3-PG) a partir de 1,3-difosfoglicerato (1,3-DPG) y permite la acumulación de 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG). La razón aparente de la gran cantidad de este compuesto encontrada en el hematíe (una molécula de DPG por una molécula de Hb) radica en su efecto profundo sobre la afinidad de Hb por el oxígeno [38, 47].

2.1.3. Hemoglobina.

Los hematíes estan compuestos por una proteína que da a la sangre su color característico denominada hemoglobina (Hb), ésta interviene en procesos fisiológicos de gran importancia, siendo

éstos el transporte de O_2 de los pulmones a los tejidos y del bióxido de carbono (CO_2) de los tejidos a los pulmones; asimismo participa en la regulación ácido-básica eliminando CO_2 en los pulmones y amortiguando los cambios de pH por la acción de los grupos histidina-imidazol de la hemoglobina [56]. La Hb es una proteína conjugada, constituida por una proteína enlazada a un grupo prostético orgánico complejo y a un átomo metálico (Fe^{2+}) (Fig. 2-4). La parte proteínica recibe el nombre de globina; el átomo de metal asociado con ella es un átomo de hierro divalente y la parte orgánica es una porfirina (protoporfirina IX). La combinación de hierro y porfirina se designa como grupo heme. Este grupo es idéntico en todas las variaciones de hemoglobina humana. La parte proteica de la molécula (globina) consta de 4 cadenas de polipéptidos, de las cuales 2 cadenas son constantes en los 3 tipos de hemoglobinas normales: Hb A₁ ($\alpha_2\beta_2$), Hb A₂ ($\alpha_2\delta_2$) y Hb F ($\alpha_2\gamma_2$) [56, 72, 89].

2.1.3.1. Metabolismo de la Hemoglobina.

Desde el momento en que el eritrocito entra en la circulación y pierde su ácido ribonucleico (RNA), sufre de forma gradual cambios metabólicos a lo largo de sus 120 días de vida. Entonces la célula menos viable, que empieza a envejecer, es retirada de la circulación; ciertas enzimas glucolíticas disminuyen su actividad a medida que la célula envejece. Una vez extraído el hematíe de la circulación, la Hb se desintegra dentro de las células del sistema retículo endotelial (SRE) en sus tres constituyentes: hierro, protoporfirina y globina (Fig 2-5). El hierro queda depositado y puede ser empleado otra vez. Las cadenas de polipéptidos de la globina probablemente son degradadas y devueltas a la reserva de aminoácidos del organismo. Por el contrario el anillo de protoporfirina se desdobla, produciéndose un compuesto tetrapirrólico de cadena abierta, la biliverdina, la cual pasa rápidamente a bilirrubina por reducción y eventualmente se excreta con las heces en forma de urobilinógeno. La descomposición del anillo de protoporfirina se

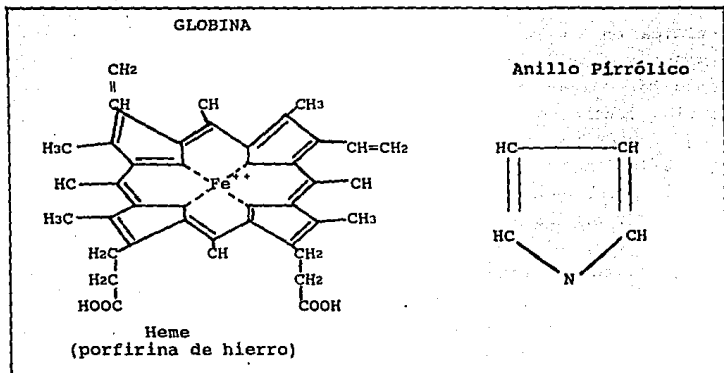


Fig. 2-4. Núcleo de porfirina de hierro. Existen 4 de estos grupos heme en cada molécula de hemoglobina, unidos a la proteína globina [56].

efectúa sólo a nivel del puente meteno α del heme, en este sitio, el átomo de carbono se oxida para formar monóxido de carbono (CO), que aparece en la sangre como carboxihemoglobina (COHb) transportado hasta los pulmones en donde se excreta con el aire expirado. Se ha demostrado que la concentración de COHb en la sangre es una medida aproximada de la destrucción endógena de la hemoglobina.

El hierro obtenido es transportado hacia la médula ósea para incorporarse a un nuevo grupo heme o permanece en las células retículo endoteliales en forma de ferritina o hemosiderina (Fig. 2.5) [34,99].

2.1.4. Inmunohematología del Hematíe.

El interés inmunológico de los hematíes se centra en su membrana, ya que ésta es la que interviene en las reacciones Antígeno-Anticuerpo (Ag-Ac). Los hematíes son relativamente

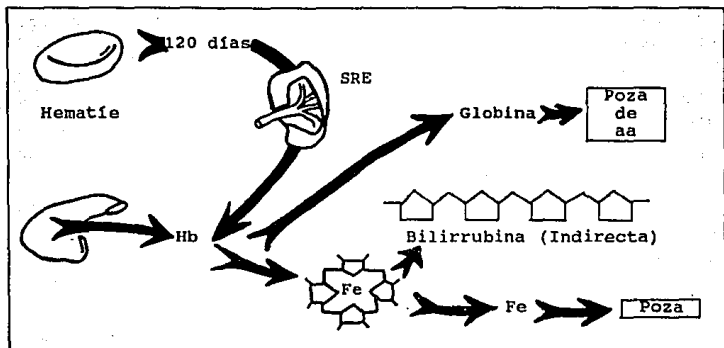


Fig. 2-5. Metabolismo de la hemoglobina: Origen y formación de bilirrubina [90].

lábiles a los agentes químicos y físicos, tienden a fragmentarse, y a que se formen fisuras, que permiten la liberación de la Hb hacia el medio circundante (lisis o hemólisis), quedando en suspensión la membrana del hematíe (estroma) y la malla intracelular. La hemólisis de hematíes producida por anticuerpos (Ac) específicos es una manifestación más de las reacciones Ag-Ac [21].

2.1.4.1. Antígenos de los hematíes.

Se han identificado por medios serológicos unos 400 antígenos en los hematíes, la especificidad inmunológica de dichos antígenos deriva de las diferencias estructurales existentes en los carbohidratos, lípidos y proteínas de la membrana eritrocitaria [72]. Los antígenos de los hematíes son estructuras químicas que proporcionan propiedades específicas a su superficie y que hasta ahora sólo pueden detectarse por la reactividad de los hematíes con anticuerpos que corresponden a estos antígenos (anticuerpos homólogos). La mayoría de estas reacciones Ag-Ac implican la aglutinación de los hematíes de tal

modo que los anticuerpos se denominan hemaglutininas y los antígenos hemaglutinógenos [34].

Son isoaglutinógenos e isoaglutininas, respectivamente, los antígenos y anticuerpos que diferencian los hematíes de un individuo de los otros de la misma especie. Algunos anticuerpos en presencia de complemento (C') hemolizan a los hematíes y por lo tanto se llaman hemolisinas [34].

El polimorfismo de los hematíes depende de las características inmunohematológicas (serológicas), las cuales se basan en la presencia o ausencia de las propiedades químicas en la superficie de los hematíes, que permite diferenciarlos y clasificarlos conjuntamente en forma de sistemas de grupos sanguíneos por sus reacciones con las hemaglutininas específicas, ej. Sistema ABO, Lewis, Ii, Rh, etc. [34, 72]

Los grupos sanguíneos muestran 3 características importantes:

- 1) Son detectables por su reactividad específica con los anticuerpos correspondientes que producen aglutinación o hemólisis.
- 2) Se transmiten por herencia, según las leyes de Mendel.
- 3) Aparecen en ciertas fases del desarrollo fetal, y están plenamente formados al nacer o al principio del crecimiento postnatal, para persistir toda la vida [18, 34].

Sistema ABO.

En este sistema existen 2 aglutinógenos (A y B) (Fig. 2-6), que están ligados a los hematíes, y dos aglutininas (Anti-A y Anti-B) que se presentan en el suero. Las características fenotípicas de este sistema se presentan en la tabla 2-2.

Algunas anomalías del sistema ABO son explicadas por la subdivisión del grupo A en A₁ y A₂; y del grupo AB en A₁B y A₂B. La importancia de estos subgrupos, es que el antígeno A en los subgrupos A₂ y A₂B es débil y los hematíes que lo contienen no pueden ser aglutinados por suero anti-A [102].

La sustancia H se encuentra sobre los hematíes del grupo O, y en menor proporción sobre los hematíes de los grupos sanguíneos A (A₁ y A₁B) y B del sistema ABO, y en los individuos del

genotipo Bombay, los cuales desarrollan anticuerpos naturales frente a los antígenos A, B y H. Por consiguiente, no pueden recibir transfusión alguna, a excepción de la sangre perteneciente a este mismo genotipo Bombay [18,72]. Los anticuerpos naturales anti-H generalmente actúan en frío (óptimo a 4°C), y en los sujetos Bombay actúan a 37°C. La propiedad de aglutinar unos hematíes determinados por la sustancia anti-H está en proporción inversa a su capacidad de aglutinar frente a sueros anti-A o anti-B en general [18].

Sistema Lewis.

Los antígenos Lewis difieren de todos los demás antígenos de los hematíes, en que no se sintetizan en el interior de éstos, sino que se absorben en su superficie [72]. El sistema está formado de 2 genes (Le^a y Le^b) con sus correspondientes anticuerpos (anti- Le^a y anti- Le^b).

Los factores Lewis son primordialmente mucopolisacáridos presentes en los líquidos corporales, inclusive en el plasma y en las secreciones (saliva) [34]. Los anticuerpos anti-Lewis consisten de inmunoglobulinas IgM, es decir, estos anticuerpos resultan ser aglutininas naturales en frío, débiles y específicas. Muy rara vez, se han atribuido reacciones transfusionales hemolíticas a estos anticuerpos, pero los antígenos Lewis no pueden ser responsables de ninguna enfermedad hemolítica [56].

Sistema Ii.

Los antígenos Ii, compuestos por carbohidratos están relacionados con los antígenos de los grupos ABO y, al igual que éstos, se hallan presentes en muchas otras células diferentes de los hematíes. Los hematíes del adulto, con raras excepciones, tienen muchos lugares antigénicos I y pocos lugares i; en cambio en la sangre de cordón existen principalmente lugares antigénicos i; la conversión al patrón adulto se completa hacia la edad de 2 a 3 años. En trastornos hereditarios con eritropoyesis anómala (Talasemia) y en algunos adquiridos de las mismas características (Anemia aplásica), los pacientes adultos pueden producir hematíes

que conservan rasgos de la eritropoyesis fetal, incluida la presencia de una mayor cantidad de antígeno i. El sistema Ii tiene interés clínico debido a que los anticuerpos responsables de la mayoría de casos de la enfermedad por aglutinina fría IgM tienen especificidad anti-I [26, 72].

Sistema Rh.

Cada individuo posee genes en sus cromosomas, uno procedente del padre y el otro de la madre. La presencia en un individuo de un gen D determina el carácter Rh⁺, aunque el otro gen sea d. En cambio, para que un individuo sea Rh⁻, ha de tener los 2 genes de su cromosoma d, teniéndose los siguientes fenotipos:

GENOTIPO :	DD	Dd	dd
FACTOR Rh :	positivo	positivo	negativo

El sistema Rh contiene otros antígenos además del D, d; puede considerarse que dicho sistema consta de 3 pares de genes alelomórficos C/c, D/d, E/e, localizados tan próximos entre sí en el cromosoma que se heredan como unidad de cada progenitor [18]. Algunos de los patrones antigénicos resultantes son más

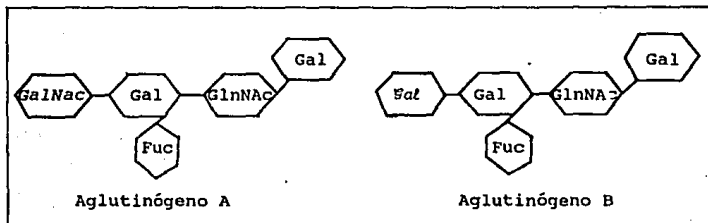


Fig.2-6. La diferencia entre un aglutinógeno A y un aglutinógeno B está dada por la adición de la N-acetilgalactosamina (GalNAc) y Galactosa (Gal) a la galactosa subterminal, confiriendo la actividad A y B respectivamente. GlcNAc = N-acetilglucosamina, Fuc = Fucosa[2].

Tabla 2-2. Características fenotípicas y reacciones de aglutinación del sistema ABO [41].

RECEPTOR		DONADOR			
ANTIGENOS (grupo sanguíneo)	ANTICUERPOS (suero o plasma)	O	A	B	AB
O	Anti-A, Anti-B	-	+	+	+
A	Anti-B	-	-	+	+
B	Anti-A	-	+	-	+
AB	ninguno	-	-	-	-

(+) Indica aglutinación de los hematíes del donante por los anticuerpos del suero (o plasma) del receptor.

(-) Indica ausencia de aglutinación.

frecuentes que otros, con pocas excepciones, el individuo Rh no es solamente D/d, sino también cde/cde.

El antígeno D es altamente inmunogénico y la incompatibilidad D es una de las causas principales de enfermedad hemolítica del recién nacido. Los otros antígenos Rh son mucho menos inmunogénicos, y solamente producen anticuerpos, después de la transfusión, en algunos individuos [72].

2.1.4.2. Anticuerpos Frente a los Hematíes.

Las inmunoglobulinas, son proteínas con actividad de anticuerpos, cada molécula se une de forma preferente a determinado antígeno, esta unión con el antígeno altera la molécula, tras lo cual puede participar en una serie de funciones efectoras como son:

- 1) Unión con el complemento y activación de éste.
- 2) Unión con un receptor existente sobre los macrófagos con la consiguiente fagocitosis del complejo Ag-Ac.
- 3) Función desencadenante de la liberación del contenido de los gránulos de los mastocitos y probablemente de los eosinófilos [15, 72].

Todas las clases de inmunoglobulinas (Ig) a excepción de la IgM tienen en común el mismo diseño básico molecular estructural

[15, 72, 84]. Algunas de las propiedades de las distintas clases de inmunoglobulinas se resumen en la tabla 2-3. En la tipificación y las reacciones de compatibilidad cruzada, los anticuerpos se dirigen contra sitios antigénicos sobre la superficie del hematíe. Cuando estos anticuerpos se combinan con antígenos eritrocitarios para formar masas macroscópicas o microscópicas de eritrocitos se produce lo que se llama aglutinación [99].

En condiciones normales, los eritrocitos permanecen separados a una distancia de aproximadamente 25 nm. Esto se atribuye a la fuerza repulsiva de las cargas negativas presentes en la superficie de los eritrocitos. Las cargas negativas en los eritrocitos se atribuyen a su contenido en ácido siálico. El grado de carga negativa en un eritrocito se ha expresado como

Tabla 2-3. Propiedades de las Inmunoglobulinas [30].

	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
-Peso Molecular (daltons).	160,000	170,000	900,000	180,000	200,000
-Concentración plasmática (g/dl)	700-1,500	250	100	3.0	0.03
-Vida media biológica (días).	21	6	5	3	2
-Distribución intravascular (%) (*)	45	40	75	75	50
-Peso placentario	SI	NO	NO	NO	NO

(*) % de la cantidad total que se encuentra dentro de los vasos sanguíneos.

"potencial zeta", término que significa la diferencia de potencial entre las cargas negativas de los eritrocitos y los cationes del medio. Los cationes del medio se pueden dividir en 2 grupos, los que están firmemente unidos a los eritrocitos y se desplazan junto con ellos y los que se mueven libremente en el medio. La frontera entre ambas capas de cationes se conoce como

"frontera de Shear" o "plano dormido". Este punto es en donde se miden los potenciales zeta y se expresan en $-mV$ (Fig. 2-7). El ámbito óptimo para anticuerpos IgM es de -22 a -17 mV , y para IgG de -11 a -4.5 mV . Cuanto menores son los valores numéricos del potencial zeta, menor es la distancia entre los eritrocitos [34]. Los anticuerpos IgG forman puentes intercelulares, recubren los eritrocitos pero no hay aglutinación y por tanto se llaman anticuerpos incompletos. Los anticuerpos IgM causan aglutinación de los hematíes en solución salina y se denominan anticuerpos completos [84,99].

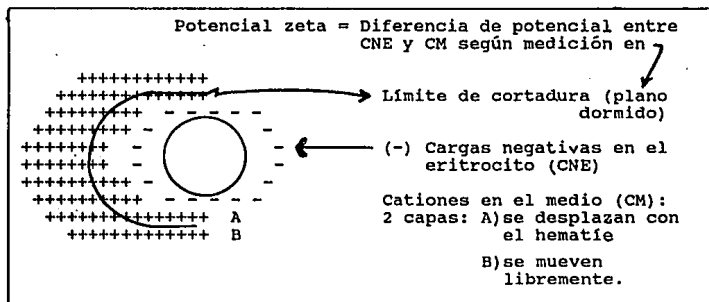


Fig.2-7. Presentación esquemática de la medición del potencial zeta de los eritrocitos [34].

Clases de Anticuerpos frente a los hematíes.

(A) ANTICUERPOS IgM: Son moléculas grandes, con 10 lugares de combinación antigénica por molécula, pueden abarcar el espacio existente entre los hematíes y a unirse más de uno de ellos en dichos lugares antigénicos. Estos anticuerpos se unen con mayor facilidad a los hematíes a temperaturas inferiores a la del organismo [15, 18, 72, 84]. Los anticuerpos IgM activan el

complemento (C') sobre la membrana del hematíe, la activación del complemento por la vía clásica requiere la unión de un componente del complemento, denominado C_{1q}, a un lugar que quede disponible sobre la porción carboxilo terminal (fragmento Fc) de una molécula de anticuerpo, después de la reacción entre el antígeno y el lugar para su fijación existente en aquélla. Los anticuerpos IgM de importancia clínica son:

- 1) Isoaglutininas ABH
- 2) Aglutininas frías que pueden desarrollarse tras una infección o con manifestación de un trastorno inmunológico [72].

(B) ANTICUERPOS IgG: Son moléculas de tamaño menor que los anticuerpos IgM, cada molécula posee 2 lugares de combinación antigénica, una sola molécula no puede generalmente reaccionar con dos hematíes suspendidos en suero fisiológico. Los anticuerpos IgG pueden fijar o no el C' a la membrana del hematíe; ello depende del número y clase de IgG de las moléculas de anticuerpo que se unen a dicha membrana. Los anticuerpos IgG de importancia clínica son:

- 1) Los isoanticuerpos responsables de la enfermedad hemolítica del recién nacido (EHRN)
- 2) Los anticuerpos responsables de la anemia hemolítica autoinmune (AHAI) de tipo caliente [30, 72].

Isoanticuerpos (Aloanticuerpos).

Un isoanticuerpo antihematíe es un anticuerpo de reacción frente a los hematíes de la misma especie, pero no frente a los del individuo que produce el anticuerpo. La hemólisis debida a isoanticuerpos se observa en 2 circunstancias clínicas:

- a) Reacciones hemolíticas transfusionales.
- b) Enfermedad hemolítica del recién nacido (EHRN) [69, 72].

Autoanticuerpos.

Un autoanticuerpo frente a los hematíes es un anticuerpo que reacciona con un antígeno existente sobre los hematíes del mismo individuo que elabora aquél [15, 69, 72]. Los autoanticuerpos se

clasifican como:

1) Autoanticuerpos de reacción en caliente. Reaccionan óptimamente a temperaturas de 40°C. Existen dos tipos:

a) Autoanticuerpos calientes incompletos. Son llamados así porque no aglutinan eritrocitos en salina. Son detectables en la prueba directa de antiglobulinas (PAD) en los eritrocitos de pacientes y pueden ser detectados en el suero en la prueba indirecta de antiglobulinas (PAI) o por técnicas más sensibles en las cuales los eritrocitos reciben un tratamiento enzimático [2, 26].

b) Autohemolisinas calientes. Estos anticuerpos por definición son capaces de lisar eritrocitos in vitro por activación de C₁q. Las autohemolisinas calientes son autoanticuerpos IgM y son de 2 clases:

i) Autohemolisinas calientes capaces de lisar eritrocitos normales in vitro. Ellas causan lisis severa intravascular de los eritrocitos y pueden ser directamente responsables de la muerte del paciente [26].

ii) Hemolisinas calientes que reaccionan in vitro solamente con células enzimáticas. La mayoría reaccionan con antígenos susceptibles a la destrucción por fosfolipasa [26].

2) Autoanticuerpos de reacción en frío. Corresponden a inmunoglobulinas IgM, su reactividad serológica ocurre a 4°C, pero también reaccionan a 25°C y 31°C [69, 72]. Existen 2 clases:

a) Autoaglutininas frías y hemolisinas frías: son capaces de aglutinar y hemolizar hematíes sin tratar in vitro. Ellas reaccionan a 0°C y 4°C [26].

b) Hemolisinas bifásicas: Son IgG, autoanticuerpos unidos a complemento que se unen a hematíes sin tratar a temperaturas bajas, pero que aglutinan estas células solamente en forma débil en salina [26].

2.1.5. Desequilibrio del Hematíe.

Normalmente existe un estado de equilibrio entre la formación y destrucción de los elementos figurados de la sangre; lo que se refleja en la concentración celular que es prácticamente constante. Si la producción de células es insuficiente o su destrucción excesiva, ello se traducirá por un cuadro hematológico alterado de manera transitoria, o más o menos permanente [3, 102]

En el caso de los hematíes cuando el mencionado equilibrio se rompe, ya sea porque su producción es menor o porque su destrucción es mayor o bien porque hay una pérdida anormal de ellos, el resultado es la aparición de ANEMIA [72]. Sin embargo, no es conveniente concluir que hay anemia, basándose exclusivamente en la cifra de los eritrocitos. En efecto, debe tenerse en cuenta que la función de éstos, o sea el transporte de oxígeno (O₂) y bióxido de carbono (CO₂) depende de la hemoglobina (Hb). De ahí que, en el fondo lo que importa es la cantidad de esta sustancia, la cual no siempre guarda un paralelismo estricto con el número de hematíes [35, 49, 99, 102].

La Anemia no constituye una entidad nosológica sino que es la consecuencia de condiciones y circunstancias numerosas, entre las que se encuentran: pérdida de sangre, destrucción excesiva de hematíes, deficiencias de las sustancias indispensables para la eritropoyesis, disminución de la eritropoyesis debida a agentes físicos, químicos o de causa desconocida, por defecto en la utilización de hierro, suplantación de los elementos eritropoyéticos y otras causas múltiples [72, 99, 102]. La anemia es siempre signo de un proceso patológico subyacente y no constituye por si misma un diagnóstico específico. De ahí que la clasificación ideal de las anemias es la etiológica, la que además indica automáticamente cual debe ser la conducta terapéutica por seguir [34, 35].

Para aceptar que hay anemia es conveniente contar con las 3 determinaciones siguientes: la Hb en g/100 ml de sangre, por ser el dato que más importa desde el punto de vista fisiopatológico; el número de hematíes/mm³ como dato complementario del anterior;

y el volumen globular o "hematocrito", por ser el procedimiento con menos coeficiente de error, lo cual permite utilizarlo en cierta forma a manera de "control" de los otros datos, asimismo éstos nos permiten clasificar el tipo morfológico de las anemias en función de los índices de Wintrobe; Volumen Corpuscular Medio (VCM), Hemoglobina Corpuscular Media (HCM) y Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media (CHCM). En base a estos índices las anemias se clasifican como: Macrocíticas (Anemia Perniciosa), Normocíticas (Anemias Hemolíticas), Microcítica Simple y Microcítica Hipocrómica [99].

Los hematíes normales tienen una vida media de aproximadamente 120 días, pero en los padecimientos hemolíticos se reduce considerablemente, y si la médula ósea no puede compensarla se desarrolla anemia. Las Anemias Hemolíticas provienen de una destrucción excesiva de los hematíes manifestadas por un acortamiento en la supervivencia de ellos, tal defecto constituye la definición de hemólisis [34, 35, 102].

Cuando la destrucción diaria de hematíe es mayor, entonces se dice que hay hiperhemólisis, o bien que se establece un estado hemolítico. La existencia de hiperhemólisis no siempre implica el que haya anemia [3]. En efecto, si la capacidad de reacción o de compensación de la médula ésta intacta la producción de hematíe puede aumentar hasta 5 a 8 veces sobre los valores basales en el plazo de una semana [72], lo que implica que mientras la hemólisis no tenga un incremento tal que sea superior a esa capacidad funcional de la eritropoyesis, no habrá anemia. En ese caso, se dice que el estado hemolítico está compensado. Si por el contrario, la hemólisis es más de 8 veces superior a lo normal, que es cuando la vida del hematíe es menor de 20 días, aparece anemia, y el estado hemolítico se conceptúa como descompensado [3, 102].

La hemólisis produce diferentes pigmentos séricos y urinarios que difieren según sea el tipo de hemólisis: Hemólisis Extravascular o Hemólisis Intravascular.

2.1.5.1. Hemólisis Extravascular.

La Hemólisis Extravascular (HE) tiene lugar como consecuencia de un aumento de la fagocitosis de los hematíes por parte de los fagocitos mononucleares existentes en el bazo, hígado y médula ósea (Fig. 2-8) [47, 72].

Dado que los hematíes viejos se eliminan normalmente por estos mecanismos, los cambios pigmentarios que ocurren en la HE corresponden a una exacerbación del patrón pigmentario normal. Cuando la Hb se cataboliza en un macrófago se desdobla en: aminoácidos (aa) que son reutilizados, el hierro (Fe) se separa del heme y también vuelve a reutilizarse, pero la molécula de protoporfirina se desintegra y se elimina como sigue: La estructura del anillo de dicha molécula se abre formándose un tetrapirrol de cadena recta, denominado biliverdina. Ésta se reduce en los macrófagos a bilirrubina, penetra luego en el plasma en donde se une a la albúmina y, por consiguiente, se mide en forma de bilirrubina de reacción indirecta. El hígado extrae la bilirrubina y la convierte en glucurónido de bilirrubina, que se mide en forma de bilirrubina de reacción directa. El glucurónido de bilirrubina se elimina por la bilis. Las bacterias intestinales convierten la bilirrubina en urobilinógeno, que se excreta por las heces, aunque una pequeña cantidad de éste se reabsorbe; la mayor parte de este urobilinógeno reabsorbido se vuelve a excretar por el hígado hacia el intestino, pero una pequeña fracción se elimina por la orina [72].

En condiciones normales en la HE: Cada gramo de Hb da lugar a 35 mg de bilirrubina. Puesto que normalmente se desdoblán cada día unos 6 grs. de Hb, se deben eliminar diariamente unos 200 mg de bilirrubina. El hígado normal puede hacer frente a ellos sin dificultad; por consiguiente, el suero contiene normalmente menos de 0.2 mg de bilirrubina de reacción directa y menos de 0.8 mg de bilirrubina total por decilitro. Alrededor de 150 mg de urobilinógeno se eliminan diariamente por las heces; la excreción urinaria normal no excede de 4 mg en 24 hrs. En la HE los mecanismos normales de eliminación pueden estar operando a un ritmo hasta 10 veces superior al normal. El notable aumento de la

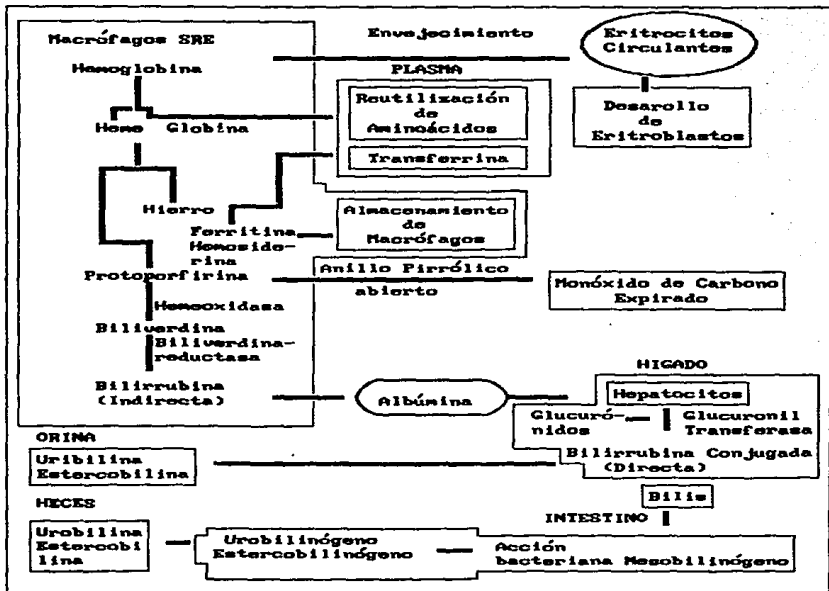


Fig 2-3 - HEMOLISIS EXTRAVASCULAR. Principal vía de destrucción de los hematíes y degradación de hemoglobina por el sistema Reticulo-endotelial. Corresponde a un 98% de la degradación diaria normal [47].

carga de bilirrubina que a ello da lugar ocasiona lo siguiente:

- 1) En el plasma, una elevación de la bilirrubina indirecta. Los niveles pueden alcanzar 3 a 4 mg/dl, pero no se elevan más a no ser que exista una alteración simultánea de la función hepática (acción prehepática).
- 2) En la orina, un aumento de eliminación de urobilinógeno, lo que hace que la orina estancada se vuelva oscura. La orina no contiene bilirrubina, ya que la unida a la albúmina (bilirrubina indirecta) no se excreta normalmente en orina. [72].

2.1.5.2. Hemólisis Intravascular.

Cerca de un 10% de la desintegración diaria normal de los hematíes tiene lugar dentro del sistema vascular. Por consiguiente, se liberan cada día en el plasma unos 0.6 g de Hb. La molécula de Hb compuesta de 2 pares de cadenas polipeptídicas ($\alpha_2\beta_2$) se desdoblan en el plasma en forma de dímeros ($\alpha\beta$) los cuales se unen inmediatamente a una globulina que posee una elevada afinidad hacia ellos denominada Haptoglobina (Hp). Las células parenquimatosas hepáticas eliminan el complejo dimérico Hp-Hb de la circulación (Fig.2-9) [47, 72].

Por consiguiente, los niveles normales de la Hb plasmática son muy bajos, menores de 5 mg/dl. Esta fijación con la Hp impide la excreción de los dímeros en la orina y por consiguiente sirve para conservar los 1.5 mg de Fe que se perderían de otra forma por esta vía diariamente procedentes del mencionado desdoblamiento de los 0.6 g de Hb [72]. La concentración plasmática de Hp medida por la cantidad de Hb añadida que puede fijar una muestra de suero es de unos 150 mg/dl. La Hemólisis Intravascular (HI) masiva desborda esta capacidad de fijación con la Hb; a consecuencia de ello tiene lugar lo siguiente:

- 1) En el plasma, la Hp desaparece y sólo se encuentran complejos diméricos Hp-Hb:
 - a) Existe aparición de complejos diméricos y metahemoglobina (MetaHb), el plasma da una apariencia de color entre rosado y púrpura. Estos dímeros libres pueden:

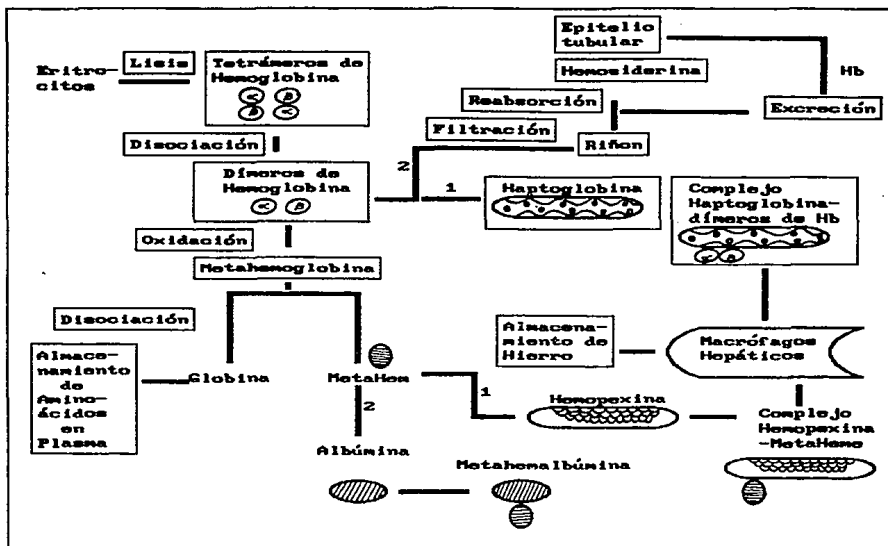


Fig. 2-9. HEMOLISIS INTRAVASCULAR. Uía de transporte de la hemoglobina como resultado de la destrucción de los hematíes en los vasos sanguíneos. Corresponde a un 18% de la desintegración diaria normal, dentro del sistema vascular [47].

- i) Ser eliminados en orina
 - ii) Ser captados por las células parenquimatosas hepáticas y por los fagocitos mononucleares.
 - iii) Disociarse en el seno del plasma para formar ferriheme (heme oxidado) y globina [72].
- b) Formación de metahemalbúmina. El ferriheme del plasma se une a una globulina que posee una elevada afinidad hacia el heme libre, denominada Hemopexina (Hx). Sin embargo, la capacidad de fijación del heme que posee la Hx queda pronto superada por lo que el ferriheme se une entonces a la albúmina y se forma la metahemalbúmina (Mha). Por consiguiente, la Mha más que la Hb libre del plasma, es el pigmento plasmático que debe investigarse cuando se trate de buscar signos de hemólisis intravascular (la Mha que da al plasma un aspecto fangoso amarillado puede cuantificarse con facilidad con el espectrofotómetro) [47, 69, 72].
- 2) En la orina:
- a) Hemoglobinuria. Los dímeros de Hb y MetaHb que se filtran en la orina, se eliminan cuando la cantidad filtrada supera la capacidad limitada de las células tubulares para reabsorberlos. La hemoglobinuria resultante confiere a la orina un color entre rojo púrpura y negro [47, 69, 72].
 - b) Hemosiderinuria. Los dímeros reabsorbidos se desdoblán dentro de las células tubulares renales. Por consiguiente, cuando la HI es crónica, el Fe se acumula en el seno de dichas células en forma de gránulos de hemosiderina. Las células tubulares pasan a la orina con lo que se produce una hemosiderinuria que puede demostrarse por medio de una tinción para el Fe practicada en el sedimento urinario. Por lo tanto, mientras que la hemoglobinuria se observa en la HI aguda y masiva, la hemosiderinuria es el signo clave de la HI crónica [56, 72].

2.1.6. Clasificación de los Trastornos Hemolíticos.

Algunas clasificaciones que se tienen de los trastornos hemolíticos son las siguientes: 1) Intracorpúsculares (Intrínsecas) y Extracorpúsculares (Extrínsecas) y 2) Intravasculares y Extravasculares. Este último esquema no es perfecto, ya que la HE puede ser tan intensa que se producen signos de HI y el primer esquema tampoco es perfecto porque muchos trastornos hereditarios se manifiestan sólo en la edad adulta, limitando el valor diagnóstico diferencial del esquema, ambos esquemas incluyen un número tan grande de trastornos, en cualquiera de las dos categorías, que las posibilidades son múltiples [72]. La mejor clasificación de las anemias en general es etiológica (Tabla 2-4) para los fines de esta tesis [34,72], basada en las anemias hemolíticas.

Cada una de las Anemias Hemolíticas (HA) anteriores tiene características clínicas propias que se manifiestan según sea el caso. Todas ellas tienen importancia clínica en función de su incidencia en cada país. Los hallazgos de laboratorio en cada tipo de enfermedad varían según el sitio, la cantidad y la velocidad de destrucción de los hematíes. Por lo tanto, la hemólisis se presenta en forma intravascular o extravascular, de lo cual dependerá la aplicación de técnicas para evaluar las muestras de sangre, orina, heces, médula ósea u otras muestras biológicas del paciente en cuestión [3, 10, 18].

Para el diagnóstico de una AH es importante considerar el origen de ésta y los factores adyacentes a ella, por lo que en base a lo anterior se proponen 2 tipos de pruebas: BASICAS Y ESPECIFICAS.

TABLA 2.4. CLASIFICACION ETIOLOGICA DE LAS ANEMIAS HEMOLITICAS (LAWRENCE, 1989) [47].

I. ANEMIAS HEMOLITICAS NO INMUNOLOGICAS.

1) ANEMIAS HEMOLITICAS DEBIDAS A ANOMALIAS HEREDITARIAS DE LA MEMBRANA:

ENFERMEDAD	ORIGEN	ETIOLOGIA
A) Esferocitosis Hereditaria (EH)	Hereditaria (Autosómica Dominante) [31]	Defecto de membrana en el hematíe por la incapacidad de la espectrina para fijar la proteína 4.1 [31, 68, 66, 72, 96]
B) Eliptocitosis Hereditaria.	Hereditaria Homocigótica o heterocigótica (Autosómica dominante) [34, 72].	Defecto en la espectrina que dificulta su autoagrupación para formar tetrámeros. En otros casos se debe a la fijación de la anquirina a la proteína 3, o en ausencia de la proteína 4.1 [19, 34, 61, 72, 93].

2) ANEMIAS HEMOLITICAS DEBIDAS A DEFECTOS ADQUIRIDOS DE LA MEMBRANA:

A) Hemoglobinuria Paroxística Nocturna (HPN).	Anomalia adquirida intrínseca [72]	Disminución de la actividad del Factor Acelerador de la Degeneración (FAD) [72], así como Inhibidores de la Lisis Reactiva de Membrana (MRL o CD59) y proteínas de unión al CB [24, 59, 64, 78].
---	------------------------------------	--

3) ANEMIAS HEMOLITICAS DEBIDAS A DEFICIENCIAS ENZIMATICAS EN EL HEMATIE:

A) Déficit de Glucosa-6-Fosfato-deshidrogenasa (6-GDP).	Herencia ligada al sexo (♀) (Homocigótica o Heterocigótica) [18, 99]	Deficiencia enzimática en la vía de las pentosas para catalizar la reacción: Glucosa-6-Fosfato + NADP 6-Fosfogluconolactona + NADPH [11, 12, 18, 28]
---	--	---

B) Déficit de Piruvato Cinasa (PC).

Hereditario: Homocigótica o Heterocigótica (Autosómico recesivo) [18, 72, 99]

Deficiencia enzimática en la vía de Embden-Meyerhof por la incapacidad de los hematíes para producir ATP y convertir el NAD a NADH [13, 18, 28, 72, 99]

C) Deficiencia de Metahemoglobín reductasa:

a) Déficit de la diáforasa o NADH-metahemoglobín reductasa.

Congénita, hereditaria en homocigóticos (Autosómico recesivo) [18].

Déficit de la enzima dependiente de la glucólisis en el ciclo de Embden-Meyerhof en donde está inhibido el paso de metahemoglobina en el interior del hematíe [18].

b) Déficit de la Hemoglobín reductasa o NADPH-metahemoglobín reductasa.

Congénita [18]

Deficiencia de la coenzima de la glutatión-reductasa no habiendo regeneración del glutatión reducido GSH (dador de grupos sulfhidrilo SH) provocando la oxidación de la globina y de diversas proteínas estructurales [18, 183].

4) ANEMIAS HEMOLITICAS POR DEFICIENCIA EN LA PRODUCCION Y DEFECTOS DE LA HEMOGLOBINA

A) Talasemias

Hereditario

Se trata de una serie de síndromes semejantes, los cuales tienen en común un defecto en la síntesis de alguna cadena normal de globina y por ello también deficiencia de alguna hemoglobina normal, deficiencia que es muchas veces compensada por aumento de otro tipo de hemoglobina [18, 51, 72, 99].

a) α -Talasemias: Estados homocigóticos (Muerte Fetal)
Estados heterocigóticos:
-Hemoglobinopatía H
-Portadores (casos leves). [18, 34]

b) β -Talasemia: Talasemia mayor (Enfermedad de Cooley).
 Talasemia menor (Enfermedad de Rietti-Greppi-Micheli).
 Talasemia mínima.

c) δ -Talasemia.

d) γ -Talasemia (Posibilidad).

e) Estados similares a la Talasemia: Hemoglobina Lepore.
 Persistencia Hereditaria de la Hemoglobina F.

f) Estados asociados: Interacciones Talasemia-Hemoglobinopatía.

B) GLOBINAS PATOLÓGICAS POR ALTERACIÓN DE LAS SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS DE LAS CADENAS GLOBÍNICAS:

- Deleciones (falta de uno o mas aminoácidos)
- Sustituciones.
- Mezcla de cadenas [18].

a) Hemoglobinopatías α -Homocigóticas:

- Anemia Drepanocítica (Enfermedad S-S)	Hereditario	Sustitución del ácido glutámico β_6 por la valina [18].
- Trastorno por Hb C	Hereditario	Sustitución del ácido glutámico β_6 por la lisina [18].
Enfermedad de la Hb C-C	Hereditario	Sustitución del ácido glutámico β_6 por la lisina [18].
- Hemoglobina D	Hereditario	Sustitución de la glicina en la la cadena β_{16} , por arginina [18]
Hb ^S _{St Luis}	Hereditario	Sustitución de la $\alpha^{68Asn-Lis}$ ^A β_2
- Hemoglobina E	Hereditario	Sustitución del ácido glutámico β_{26} por la lisina [18].

b) Hemoglobinopatías β -Heterocigóticas (El cuadro clínico y los hallazgos de laboratorio son poco significativos) [18].

c) Interecciones drepanocitosis-talasemia:

Hb D-Talasemia

Hb S/Persistencia Hereditaria de la Hemoglobina Fetal (HbS/PHF).

Hb S/Hb C.

Hb S/Hb D.

Hb S/Hb E.

Hb S - Talasemias.

Otras hemopatías.

[18, 72].

5) ANEMIAS HEMOLITICAS CAUSADAS POR AGENTES INFECCIOSOS:

A) Malaria y otros parásitos de la sangre (Toxoplasma gondii). Adquirido

La hemólisis, es en parte, una consecuencia directa de la invasión celular por los merozoitos (formas parasitarias que invaden los hematíes circulantes) [69, 181]. Un importante mecanismo en el desarrollo de la hemólisis es un proceso inmune mediado por el complemento (C'). Los antígenos de la malaria pueden comenzar a atacar la superficie de los hematíes estando o no los parásitos alojados en las células, posteriormente, los anticuerpos y el C' atacan a los antígenos unidos a la célula y conducen a la célula cubierta a la fagocitosis en el bazo [181].

B) Hemólisis debida a agentes bacterianos y sus toxinas:

a) Clostridium perfringens

Adquirido

y

Clostridium botulinum

La hemólisis resulta de la elaboración de α -toxina clostridia la cual es lecitinasa y que junto con proteasas ataca la membrana lipoproteica del hematíe para formar lisolecitinas altamente líticas que producen severa hemólisis [14, 69, 181].

b) Babesia sp.

Adquirido

La hemólisis resulta de la infección del protozooario transmitido por palomas, esta enfermedad zoonótica tiene un reservorio animal en ciertas especies de animales domésticos. La Babesia puede producir mecanismos hemolíticos similares a la infección por malaria [69].

c) Bartonella bacilliformis

Adquirido

(Fiebre de Oraya, Enfermedad de Carrion's o Bartonellosis)

La fiebre de Oraya es una enfermedad fatal en Perú, Ecuador y Colombia. La gente de estas áreas puede desarrollar una lesión verrucosa en la piel y un enfermedad hemolítica severa con fiebre después de un piquete procedente de Phlebotomos verrucosus infectado con Bartonella bacilliformis [58, 59].

C) Destrucción de hematíes causada por la exposición a:

a) Venenos (procedentes de insectos: abejas, arañas y escorpiones; mordeduras de serpientes).	Adquirido	Ciertos venenos de algunas serpientes (grupo <u>Elapidae</u> , ej. cobras) contienen <u>lecitinas</u> , la cual es capaz de disolver la <u>lecitina</u> dentro de la membrana de los hematíes y desencadenar por consiguiente la hemólisis (35, 69).
b) Químicos:		
-Arsénico.	Adquirido	La inhalación de gas arsenioso puede causar una severa anemia, ictericia y hemoglobinuria. La morfología de los hematíes es normocítica y normocromica a pesar de la severa hemólisis (69).
-Plomo.	Adquirido.	La hemólisis es debida a la interferencia con la producción de energía de la célula, pero el principal efecto del plomo es la interferencia con la producción del hemo. Varias enzimas son inhibidas, incluyendo el ácido δ -aminolevulínico sintetasa, ácido δ -aminolevulínico dehidrasa, hemo sintetasa, porfirinógeno decarboxilasa y coproporfinógeno oxidasa (69).
-Cobre.	Adquirido.	El efecto tóxico esta relacionado a la inhibición de los sistemas enzimáticos reductores de la membrana celular así como también a la inhibición de las enzimas de la vía glicolítica (69).

II) ANEMIAS HEMOLITICAS INMUNOLOGICAS.

1) ANEMIAS HEMOLITICAS AUTOIMMUNES (AHA):

ENFERMEDAD	ORIGEN	ETIOLOGIA
A) Anemia Hemolítica Inducida por fármacos (α -metildopa).	Inducida	Estimula la formación de autoanticuerpos frente a los hematíes [72].
B) Hemoglobinuria Paroxística a Frío (HPP).	Adquirida	Causada por una hemolisina bitérmica. Este anticuerpo bitérmico es una IgG unida al hematíe solamente por frío (en general solo por debajo de 15°C) y fija el complemento. La lisis aparece debido a la máxima activación del complemento que ocurre cuando la sangre adquiere su temperatura normal (37°C) [34, 56, 99].
C) Enfermedad por aglutininas frías.	Adquirida	La enfermedad hemolítica se produce por un autoanticuerpo frío el cual reacciona óptimamente a 4°C y también reacciona entre 25 a 31°C. El anticuerpo usualmente es una IgM la cual es completamente eficiente para activar el complemento (C') [69].

2) ANEMIAS HEMOLITICAS ISOIMUNES (AHI).

ENFERMEDAD	ORIGEN	ETIOLOGIA
A) Enfermedad Hemolítica del Recién Nacido (EHRN).	Adquirido	Es el resultado de la formación de anticuerpos Rh en una mujer Rh negativo con un feto Rh positivo por incompatibilidad del Rh y grupo sanguíneo (34, 69). Los isoanticuerpos maternos transferidos al feto reaccionan con los hemates incompatibles y causan hemólisis y acumulación de bilirrubina no conjugada en el suero (69, 99).
B) Reacciones hemolíticas por transfusión:	Adquirido	La hemólisis de los hemates es causada por los anticuerpos presentes en el receptor o, menos frecuentemente, una destrucción de los hemates del receptor causada por los anticuerpos transfundidos (34, 69).
- Anticuerpos presentes en el receptor.		
- Anticuerpos presentes en el donador.		

III.- OBJETIVOS

- A) Integrar los métodos de laboratorio aplicables en el diagnóstico de Anemias Hemolíticas.

- B) Llevar a cabo el montaje de pruebas básicas y pruebas específicas para el diagnóstico y clasificación de Anemias Hemolíticas.

- C) Realizar la estandarización de las pruebas básicas y específicas en el diagnóstico de Anemias Hemolíticas en función del material y equipo existente en la sección de Análisis Clínicos y Patología de la Facultad.

- D) Integrar y actualizar los mecanismos de hemólisis, con la finalidad de conocer la patofisiología del trastorno hemolítico como base fundamental de las pruebas para el diagnóstico.

- E) Elaborar un Manual sobre Anemias Hemolíticas como apoyo académico a futuros y actuales profesionistas del área de la Salud.

IV.- MATERIAL Y METODOS

4.1 PRUEBAS BASICAS

Estas pruebas nos permiten la valoración analítica inicial de una Anemia en un paciente, con el fin de clasificar el tipo de Anemia, confirmar o descartar la existencia de alteraciones morfológicas de los hematíes que sugieran un trastorno en su producción o una hemólisis y además averiguar las bases cinéticas de la Anemia (fallo en la producción de hematíes pérdida rápida de éstos o ambos mecanismos a la vez) [49]. Estas pruebas básicas comprenden a:

- 1) Hemograma de la Fórmula Roja.
 - a) Recuento de hematíes.
 - b) Determinación de Hemoglobina (Hb).
 - c) Determinación de Hematocrito (Hto).
 - d) Determinación de los Indices de Wintrobe:
 - Volumen Corpuscular Medio (VCM).
 - Hemoglobina Corpuscular Media (HCM)
 - Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media (CHCM).
- 2) Valoración y estudio de la extensión sanguínea (serie roja).
- 3) Recuento de reticulocitos e Índice Reticulocitario (IR)

4.1.1. Hemograma de la Fórmula Roja.

4.1 1.1. Recuento de Hematíes.

Fundamento [34]:

El principio de los recuentos de hematíes consiste en diluir la sangre anticoagulada en una proporción con el líquido de Hayem y luego examinar al microscopio, por medio de un hemocitómetro una pequeña cantidad de la muestra, contando el número de hematíes que se advierten en la cámara reticulada y calculando por medio de sencillas operaciones aritméticas el número que de éstos elementos existen por mm^3 de sangre.

Material:

Hemocitómetro (Cámara de Neubauer).

Pipetas de Thoma para hematíes.

Manguera de succión.

Gasa.

Tubos de ensayo de 13 x 100 mm.

Tapones de hule.

Microscopio óptico (binocular Rossbach)

Material Biológico:

Sangre completa.

Reactivos (Anexo 1):

Anticoagulante (sal sódica de E.D.T.A. al 5%)

Líquido de Hayem.

Método [34]:

Homogenizar la muestra de sangre. Llenar la pipeta de Thoma hasta la marca de 0.5. Limpiar el exterior de la pipeta

Con la pipeta en posición de 45° llenarla con el líquido de dilución (Hayem) hasta la marca 101. Tapar los extremos de la pipeta con los dedos índice y pulgar y agitar por rotación. durante 2 min.

Eliminar las primeras 5 gotas para quitar el diluyente del capilar de la pipeta.

Colocar el cubreobjetos sobre la cámara y llenarla por capilaridad, con la punta de la pipeta sobre el borde de la cámara (entre el cubreobjetos-cámara). Dejar en reposo la cámara durante 3 min.

Localizar la cuadrícula central con el objetivo seco débil (10x), y con el objetivo seco fuerte (40x) contar los hematíes en 5 de los 25 cuadros pequeños del centro (los 4 de los extremos y el central).

La suma de los hematíes contados se le agregan 4 ceros y el resultado es el número de hematíes por mm^3 .

Valores de referencia:

Hombres	4.6 a 6.2 x 10 ⁶	hematíes/mm ³ de sangre.
Mujeres	4.0 a 5.5 x 10 ⁶	hematíes/mm ³ de sangre. (53)

Interpretación:

Aumento eritroide:	Policitemia
Disminución eritroide:	Anemia

4.1.1.2. Determinación de Hemoglobina (Hb).

Existen diversos métodos para calcular la cantidad de Hb en la sangre: unos de tipo químico, se basan en la determinación de Fe globular; otros, en la capacidad de absorción de gases, algunos se fundan en la espectrofotometría, en la polarimetría y en determinaciones fotoeléctricas. Los procedimientos más adoptados en la práctica clínica son de índole fotocolorimétrica, y estriban en deducir el color de una muestra de sangre diluida la cantidad de pigmento hemoglobínico que contiene por medios fotocolorimétricos de tipos diversos [18].

Determinación de Hb por el método de Drabkin (Cianometahemoglobina).

Fundamento [94]:

La Hb circulante en la sangre, es una mezcla de Hb, oxihemoglobina, carboxihemoglobina y pequeñas acumulaciones de otras formas de presentación de éste pigmento, tales derivados (excepto la verdoglobina) reaccionan cuantitativamente por medio de una solución reactiva transformándose en cianuro de hemoglobina (Cianometahemoglobina). La sustancia colorida formada es muy estable y se mide en el espectrofotómetro a 540 nm.

Material:

Tubos de ensaye de 13 x 100 mm.
Gradillas para tubos de 13 x 100 mm.
Pipetas serológicas de 5 ml.
Pipetas de Sahli con tubo látex de 3 mm ø.
Espectrofotómetro (Bausch & Lomb Spectronic 20)
Celdas, con l = 1 cm.
Gasas .
Vortex.

Material Biológico:

Sangre completa.

Reactivos (Anexo 1):

Anticoagulante (sal sódica de E.D.T.A. al 5%)
Reactivo de Drabkin.

Método [94]:

Homogeneizar perfectamente la sangre y mediante la pipeta Sahli medir 0.02 ml. de sangre. Limpiar la parte externa de la pipeta.

Añadir la muestra a un tubo de ensaye de 13 x 100 mm que contiene 5 ml. del reactivo de Drabkin.

Lavar 3 veces la pipeta con el líquido, mezclar bien y esperar 10 min. para realizar la lectura.

Calibrar el espectrofotómetro con el blanco de reactivo (5 ml. de reactivo de Drabkin) a cero de absorbancia. Realizar la lectura de la muestra (Absorbancia) a 540 nm.

Cálculo:

g de Hb/100 ml. de sangre = Absorbancia x 36.8

Valores de referencia:

Hombres 14 a 18 g Hb/100 ml. de sangre.
Mujeres 12 a 16 g Hb/100 ml. de sangre. (94).

Interpretación:

Su baja concentración indica siempre una anemia aunque también hay anemias de tipo normocrómico donde la hemoglobina no se altera. Los valores bajos en Hb, representativos de anemia pueden deberse a:

- a) Deficiencias de las sustancias que intervienen en su formación, ej. Fe, proteínas, cobre, etc.
- b) Alteraciones de los órganos que la sintetizan y destruyen (hígado, médula ósea y bazo).
- c) Baja en el número de hematíes y la excesiva destrucción de éstos [34, 47, 99].

4.1.1.3. Determinación de Hematocrito (Hto) [34].

Existen diferentes procedimientos para determinar los volúmenes respectivos de los eritrocitos y el plasma. Unos son indirectos y otros directos, siendo éstos últimos los más empleados. Dentro de éstos se tienen al macrométodo (Técnica de Wintrobe) y el micrométodo (Microhematocrito).

Determinación de Hematocrito por la técnica de microhematocrito.

Fundamento [34, 99]:

El hematocrito se define como la relación del volumen ocupado por los hematíes respecto al de una muestra de sangre total, el cual se determina mediante centrifugación a velocidad y tiempo constantes, capaz de concentrar a los hematíes en el menor volumen posible. Este parámetro se expresa en forma de porcentaje (%).

Material:

Tubos capilares sin heparina.

Mechero.

Gasas.

Microcentrífuga (IFC-MB).

Lector de microhematocrito (I.C.E. CAT. No.2201).

Material Biológico:

Sangre completa.

Reactivos (Anexo 1):

Anticoagulante (sal sódica de E.D.T.A. al 5%)

Método [34]:

Homogenizar perfectamente la sangre. Llenar 3/4 partes del tubo capilar, limpiar la parte externa del tubo.

Sellar con calor la parte seca del tubo capilar.

Colocar el capilar en la microcentrífuga, con la parte sellada hacia el exterior (fuerza centrífuga). Centrifugar 5 min. a 10000 rpm.

Efectuar la lectura en la escala correspondiente (lector de microhematocrito). Hacer coincidir el menisco del paquete celular con la marca cero y el menisco del plasma con el 100, obteniendo así el % de Hto.

Valores de referencia:

Hombres 47 a 55 %

Mujeres 42 a 48 % [34]

Interpretación:

Disminución.- Significa Anemia. En la hidremia del embarazo, donde la cifra total de eritrocitos no está reducida.

Aumento.- Significa Policitemia. Normal o incluso elevado en el shock acompañado por hemoconcentración, aunque la masa total de eritrocitos puede estar considerablemente disminuída debido a la pérdida de sangre [34].

4.1.1.4. Determinación de los Índices de Wintrobe (IW)

Wintrobe ha introducido procedimientos cuantitativos para el estudio de la anemia, éstos son denominados "Índices de Wintrobe", los cuales comprenden: Volumen Corpuscular Medio (VCM), Hemoglobina Corpuscular Media (HCM) y Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media (CHCM); estos índices han constituido la base de la clasificación morfológica de las anemias. En consecuencia, estos índices habrían de calcularse en todo paciente anémico, a fin de confirmar la impresión que en el frotis se ha obtenido a cerca del tamaño celular y del contenido de hemoglobina. [56, 72, 99].

Volumen Corpuscular Medio (VCM)

Constituye el promedio de volumen del hematíe y se obtiene como sigue:

$$\text{VCM} = \frac{\text{Hto.} \times 10}{\text{Hematíes (en millones)}} \mu^3$$

Hemoglobina Corpuscular Media (HCM)

Consiste en el promedio de peso de la hemoglobina por hematíe y se obtiene como sigue:

$$\text{HCM} = \frac{\text{Hb} \times 10}{\text{Hematíes (millones/mm}^3\text{)}} \text{ pg.}$$

Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media (CHCM).

Se trata del peso de la Hb por volumen de células y representa así un indicador de la concentración de Hb en la célula media, independientemente del tamaño de ésta; se calcula como sigue:

$$\text{CHCM} = \frac{\text{Hb} \times 100}{\text{Hto.}} \text{ ,g/100 ml. de hematíes (\%)}$$

Valores de referencia:

VCM	85 a 95	μ^3	(47)
HCM	28 a 33	pg	(38, 69)
CHCM	32 a 36	%	(43)

Interpretación:

Tabla 4-1. Clasificación Morfológica de las Anemias en función de los IW [34].

INDICES	MACROCÍTICA	NORMOCÍTICA		MICROCÍTICA
VCM	↑	N	N*	↓
HCM	↑	N	↓*	↓
CHCM	N	N	↓*	↓

↑ Aumentado

↓ Disminuido

N Normal

* Normocítica Hipocrómica.

A) Anemias Macroscíticas:

- a) Anemia Perniciosa.
- b) A. Macroscítica nutricional "tropical".
- c) A. Megaloblástica del lactante.
- d) A. Macroscítica del embarazo.
- e) A. Megaloblástica refractaria.
- f) Afecciones habitualmente asociadas a anemia normocítica, en especial: Anemias Hemolíticas Macroscíticas de etiología oscura Hepatopatía crónica y extensa y Anemia Macroscítica del hipotiroidismo.

B) Anemias Normocíticas:

- a) Anemia posthemorrágica aguda.
- b) Anemia hemolítica por:
 - Agentes infecciosos, químicos, físicos, vegetales y animales.
 - Por reacciones inmunes.
 - Esferocitosis Hereditaria.

- Drepanocitosis y otras hemoglobinopatías hereditarias.
- Hemoglobinuria Paroxística Nocturna (HPN)
- Anemias Hemolíticas no esferocíticas hereditarias.

c) Anemia Aplásica o Hipoplásica.

C) Anemia Microcítica Simple:

- a) Por enfermedades inflamatorias subagudas y crónicas, y enfermedades crónicas no inflamatorias.

D) Anemias Microcíticas Hipocrómicas:

- a) Dieta deficiente en alimentos con hierro.
- b) Asociada a aclorhidria.
- c) Después de gastrectomía (total o parcial).
- d) Hemorragia crónica alimentaria o del aparato urinario.
- e) En el crecimiento y embarazos repetidos.
- f) Anemia hipocrómica del lactante.

4.1.2. Valoración y Estudio de la Extensión Sanguínea (Serie Roja).

El examen microscópico de una extensión de sangre periférica sobre un porta o sobre un cubreobjetos de vidrio produce una valiosa información de los elementos formes de la sangre. Es preciso saber valorar un frotis de sangre periférica para conducir con acierto un paciente anémico. Con demasiada frecuencia, la extensión de sangre periférica se utiliza sólo para el recuento leucocitario diferencial y para el diagnóstico de parásitos sanguíneos. En el anémico, la morfología del hematíe proporciona importantes orientaciones para el diagnóstico, siendo que ésta proporciona información relacionada con la eritropoyesis, incluyendo:

- a) Valoración de la estimulación de la eritropoyetina.
- b) Hallazgo de anomalías de maduración nuclear y citoplásmica.
- c) Detección de trastornos en la arquitectura de la médula ósea.
- d) Identificación de enfermedades específicas debido a alteraciones singulares en la forma de la célula [38, 72, 99].

Método del portaobjetos (Tinción de Wright).

Fundamento [34, 56]:

Se aprovecha para la coloración, el hecho de los diferentes pH de las estructuras celulares, de forma que éstas en ocasiones son ácidas, básicas o neutras, pudiendo ser estas reacciones de diferente intensidad. El colorante de Wright es policromático en solución de alcohol metílico, siendo una mezcla de colorante ácido (eosina) y un básico (azul de metileno). Los núcleos, siempre ácidos, toman los colorantes básicos y los protoplasmas se tiñen especialmente por los colorantes neutros, las granulaciones y las mitocondrias pueden dar diversas coloraciones específicas, o presentar apetencia para determinados colorantes.

Material:

Portaobjetos de cantos pulidos (limpios y desengrasados).

Tubos capilares.

Gasas.

Charola de tinción.

Microscopio óptico (Binocular Rossbach).

Material Biológico:

Sangre completa.

Reactivos (Anexo 1):

Colorante de Wright.

Solución amortiguadora: Buffer de fosfatos pH 6.4 a 6.5. (56)

Metanol.

Aceite de inmersión.

Método [34, 56]:

Homogenizar la sangre y tomar con el tubo capilar una muestra de sangre, colocando una gota de sangre en el extremo de un portaobjetos.

Con ayuda de otro portaobjetos, en un ángulo de 45°, dejar que la gota se extienda por capilaridad y con movimiento rápido y uniforme realizar la extensión de la gota de la sangre.

Secar al aire para evitar ruptura celular y fijar con metanol durante 2 min.

Cubrir con el colorante de Wright durante 10 min. Añadir el buffer sin eliminar el colorante, hasta que se forme una capa metálica que lo cubra y dejar durante 10 min.

Enjuagar con agua destilada y dejar secar a temperatura ambiente.

Observar al microscopio con objetivo de inmersión (100x) y evaluar las características físicas de los eritrocitos.

NOTA: El ángulo de posición y la velocidad de extensión son factores importantes para obtener una extensión gruesa o delgada.

Criterio de lectura:

Observación de las características físicas de los hematíes (Fig. 4-1).

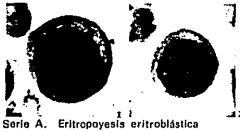
Forma: Disco bicóncavo, tamaño normal.

Color: Con halo central característico definido.

Estructura: Células maduras sin cuerpos de inclusión.

Interpretación:

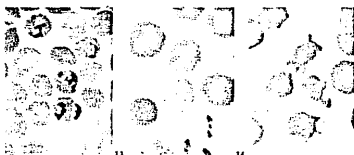
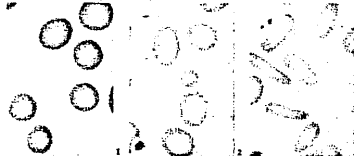
- a) Alteraciones en el color.- Ej. Policromatofilia, en donde se observan hematíes en diferente tono de azul, los cuales son reticulocitos que contienen restos de RNA, combinados con Hb indican una regeneración más activa de lo normal (Anemia Perniciosa, hemólisis excesiva, Paludismo, etc.). El punteado basófilo está caracterizado por la presencia dentro del eritrocito de granulaciones basófilas irregulares que varían en cuanto a su tamaño, desde finos puntos apenas visibles a gránulos casi tan grandes como gránulos azulófilos de



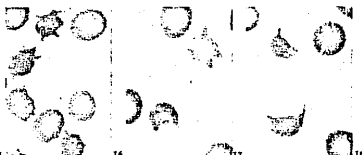
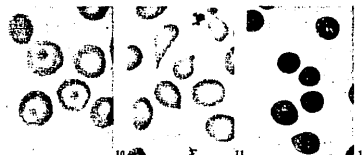
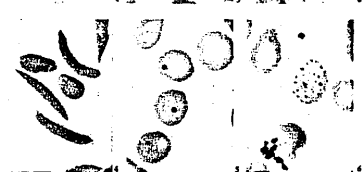
Serie A. Eritropoyesis eritroblástica



Serie B. Eritropoyesis megaloblástica



Serie C. Morfología eritrocitaria



1, Promegaloblasto. 2, Megaloblasto basófilo. 3, Megaloblasto policromatófilo. 4, Megaloblasto ortocromático. 5, Megaloblasto ortocromático con punteado basófilo y un cuerpo de Howell-Jolly. 6, Macrocyto. Tinción de Wright ($\times 1.000$).

1, Proeritroblasto. 2, Eritroblasto basófilo. 3, 4, Eritroblastos policromatófilos. 5, Eritroblastos ortocromáticos. 6, Macrocytos policromatófilos (reticulocitos). Tinción de Wright ($\times 1.000$).

1, Eritrocitos normales. 2, Eritrocitos hipocromos, microcíticos. 3, Ovalocitos. 4, Células falciformes. 5, cuerpos de Howell-Jolly. 6, Punteado basófilo. 7, Macrocyto. 8, Megalocito basófilo. 9, Cristal de hemoglobina G. 10, Dianocitos o «target cells». 11, Poliquelocitos en forma de gota. 12, Esferocitos. 13, Reticulocitos (tinción con nuevo azul de metileno). 14, Estomatocitos. 15, Acanthocitos. 16, Células en espuela o «spur cells». 17, «Burr cells», o células en cáscara rota y células en casco. 18, Esquisocitos. Todas excepto la 13, con la tinción Wright ($\times 1.000$).

Fig. 4-1. Observación del hematíe normal y anomalías físicas.

promielocitos que indican una hemopatía grave. El punteado basófilo también se presenta en exposición continua al plomo [34, 99].

b) Variaciones en el tamaño.- los eritrocitos pueden ser anormalmente pequeños o microcitos, anormalmente grandes o macrocitos o mostrar variaciones anómalas de tamaño (Anisocitosis) [34, 99].

c) Variaciones en la forma.- La presencia de formas anormales se llama Poiquilocitosis. Reciben diferentes nombres según la forma que tengan (ovalocitos, esferocitos, eliptocitos, etc.). Estas variaciones están presentes en la mayoría de las anemias y generalmente abundan en casos graves [34, 99].

d) Variaciones en la estructura.- Representadas por la presencia de células nucleadas jóvenes o inmaduras que se presentan en anemia perniciosa o leucemia: normoblastos basófilos, normoblastos policromatófilos y ortocromáticos; están presentes en anemia. Se puede encontrar restos nucleares (Cuerpos de Howell-Jolly, anillos de Cabot). La presencia de hematíes nucleados indica respuesta de la médula ósea a una mayor demanda de hematíes [34, 56, 99] (Fig. 4-1).

4.1.3. Recuento de Reticulocitos.

El recuento de los hematíes inmaduros (reticulocitos) es un método simple y directo que evalúa el grado eficaz de producción de hematíes. Debido a la liberación prematura o retardada de la médula ósea y a los diferentes grados de maduración, los reticulocitos no siempre reflejan la actividad eritroide absoluta. Sin embargo, la facilidad con que pueden ser contados en forma seriada en el mismo individuo hace del recuento reticulocitario un excelente método para valorar las variaciones del grado de producción de hematíes [84, 99].

Tinción Supravital con Azul de Cresil Brillante.

Fundamento [94]:

La tinción supravital del reticulocito con azul de cresil brillante o nuevo azul de metileno produce agregados de material de un color azul muy intenso que se distribuye en filamentos reticulares. Esto es el artefacto que da su nombre al reticulocito y se debe a la precipitación de RNA residual de los hematíes inmaduros y agregación de ribosomas, mitocondrias y otros organelos que provocan estos colorantes.

Material:

Portaobjetos de cantos pulidos (limpios y desengrasados).

Gasas.

Gradillas metálicas para tubos de 10 x 75 mm.

Pipetas Pasteur.

Microscopio óptico (Binocular Rossbach).

Tubos de ensayo de 10 x 75 mm.

Material Biológico:

Sangre completa fresca.

Ractivos (Anexo 1):

Colorante azul de cresil brillante o nuevo azul de metileno.

Método [94]:

Homogenizar perfectamente la sangre
Con una pipeta Pasteur colocar una gota de sangre en un tubo de 10 x 75 mm y adicionar dos gotas de colorante y mezclar. Dejar reposar a temperatura ambiente 5 min.
Realizar una extensión con la mezcla sangre-colorante, como para una tinción de Wright. Dejar secar al aire.
Realizar la lectura con objetivo 100x/aceite de inmersión, escogiendo la zona del frotis donde no haya superposición de hematíes.

Contar 500 células (eritrocitos y reticulocitos) y sacar el porcentaje de reticulocitos en ese total de células.

Valores de referencia:

0.5 a 2.0 % [94]

Interpretación:

Aumento: La reticulocitosis ocurre después de una hemorragia aguda o hemólisis y como respuesta al adecuado tratamiento de las anemias. Valores mayores al 3% son característicos de las anemias hemolíticas (AH) donde el hierro proveniente de la destrucción del eritrocito considerablemente aumentada permite valores altos de producción de la médula ósea [32, 84, 94].

Disminución: Reticulocitopenia asociada a un trastorno de maduración de los hematíes supresión eritropoyética, inmunodestrucción de precursores de hematíes o provisión deficiente de hierro [32, 84, 99].

4.1.4. Índice Reticulocitario.

El índice de producción de reticulocitos (IR) es una medida de la producción efectiva de los hematíes. Su fórmula es la siguiente:

$$IR = \frac{\% \text{ de reticulocitos} \times \frac{\text{Hto. paciente}}{\bar{X} \text{ Hto. normal}}}{2 \text{ (tiempo de maduración del reticulocito, en días)}} \quad (*)$$

Tabla 4.2. Relación del Hto. corregido, % reticulocitos e IR.

	% Hto.	\bar{X} % Hto.	% Reticulocitos	IR
Hombres	47 a 55	51	0.5 a 2.0	0.24 a 1.07
Mujeres	42 a 48	45	0.5 a 2.0	0.23 a 1.06

(*) Corrección de Hto.

Una vez que se ha corregido el recuento de reticulocitos por el Hto. se divide por 2 para corregir el más largo tiempo de maduración de los reticulocitos liberados prematuramente de la médula ósea para dar lugar al índice de producción [99].

Valores de referencia:

Hombres 0.24 a 1.07

Mujeres 0.23 a 1.06

Interpretación:

Los valores mayores de 2 son característicos de las anemias hemolíticas donde el hierro proveniente de la destrucción del hematíe considerablemente aumentada, permite valores altos de producción de la médula ósea [32]. Este índice de reticulocitos es de gran ayuda en la separación de los defectos proliferativos y de maduración mediante una valoración simultánea de la relación Eritropoyetina/Maduración de la médula ósea (E/M). En las anemias hipoproliferativas y hemolíticas, la relación E/M de la médula disminuye o aumenta en forma paralela a la respuesta del reticulocito. Aunque el recuento de reticulocitos aparece aumentado ya desde el comienzo de la anemia el IR no se eleva hasta los 3 a 5 días. Un nivel completo de la producción de la médula ósea medido por el IR sólo se consigue al cabo de 8 a 10 días, momento en el que la hiperplasia hemática de la médula y el IR tienen la misma magnitud. El máximo nivel de producción de hematíes que se observa hacia el décimo día después de la hemorragia está condicionado por la integridad de la médula, la cuantía de estímulo anémico y por los aportes de hierro a la médula (Tabla 4-3) [84, 99].

Tabla 4-3. Respuesta del IR frente a una Hemorragia aguda [99].

	6 hrs.	1 día	2 - 3 días	5 días	10 días
Policromasia	Comienza	+	+	++	+++
Relación E/M medular	1/3	1/3	1/2 - 1/1	1/1	1/1
Índice de Reticulocitos	1	1	1	2	3 - 5

4.2. PRUEBAS ESPECIFICAS.

Las pruebas tradicionales como las de concentración de bilirrubina directa en el suero, excreción de urobilinógeno, concentración de haptoglobina sérica y antiglobulina de Coombs, entre otras, por sí solas no constituyen índices sensibles de Anemia hmolítica (AH). Ocasionalmente la hemoglobinuria y la hemoglobinemia pueden sugerirle al médico un trastorno hemolítico. El recuento de reticulocitos es la prueba que debe usarse inicialmente para identificar si una anemia es el resultado de hemólisis. La presencia y el grado de hemólisis generalmente pueden deducirse en base al índice de reticulocitos (IR) y a la concentración de hemoglobina en sangre [49]. Por lo anterior, es necesario llevar a cabo una serie de pruebas para confirmar o descartar el trastorno hemolítico presente. Para llegar al diagnóstico correcto se propone la siguiente clasificación de pruebas (Tabla 4-4) [49]:

Tabla 4.4. Pruebas de laboratorio usadas en el diagnóstico de AH.

- I) PRUEBAS PARA DETERMINAR HEMOLISIS.**
- a) Supervivencia del hematíe marcado con Cr^{51} .
 - b) Haptoglobina sérica.
 - c) Hemopexina del plasma.
- II) PRUEBAS PARA DETERMINAR HEMOLISIS INTRAVASCULAR (HI).**
- a) Hemoglobina del plasma.
 - b) Metahemalbúmina del plasma.
 - c) Hemoglobina de orina.
 - d) Hemosiderina de la orina.
- III) PRUEBAS PARA DETERMINAR UNA ENFERMEDAD HEMOLITICA INMUNITARIA.**
- a) Prueba de antiglobulina de Coombs.
 - b) Título de aglutininas frías.
- IV) PRUEBAS PARA DETERMINAR HEMOGLOBINURIA PAROXISTICA NOCTURNA.**
- a) Prueba de hemólisis con sacarosa.
 - b) Prueba de hemólisis ácida de Ham.
- V) PRUEBAS PARA DETERMINAR ESFEROCITOSIS HEREDITARIA.**
- a) Fragilidad osmótica.
 - b) Autohemólisis.
- VI) PRUEBAS PARA DETERMINAR DEFICIENCIAS ENZIMATICAS DEL HEMATIE.**
- a) Valoración de piruvato cinasa (PC)
 - b) Valoración de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-PD).
- VII) PRUEBAS PARA DETERMINAR UNA HEMOGLOBINOPATIA.**
- a) Electroforesis de hemoglobinas anormales.
 - b) Prueba para determinar hemoglobina falciforme (HbS).
 - c) Prueba de hemoglobina álcali-resistente ($\frac{2}{3}$ HbF).
 - d) Prueba de estabilidad de hemoglobina al calor (hemoglobinas inestables).
 - i) Método microscópico: Cuerpos de Heinz en hemoglobinas inestables.
 - e) Prueba de solubilidad para hemoglobina (HbS y HbC son insolubles).

4.2.1. Pruebas para Determinar Hemólisis.

4.2.1.1. Supervivencia del Hematíe a Cr^{51} ($\text{Na}^{51}\text{CrO}_4$).

Un acortamiento en la supervivencia de los hematíes constituye la definición de hemólisis. Las mediciones directas de la velocidad de destrucción del hematíe (longevidad) pueden llevarse a cabo en el hombre determinando la rapidez de desaparición de sus propios hematíes marcados con material radiactivo. Las técnicas de supervivencia del hematíe con $\text{Na}^{51}\text{CrO}_4$ han ayudado bastante a comprender las AH. La prueba es una medición específica y sensible de la supervivencia del hematíe, pero rara vez es necesaria para la evaluación de un trastorno hemolítico. Es difícil practicarla, requiere varios días para completarse, implica la administración de radiactividad y su costo es elevado [34, 38, 49].

Fundamento [94]:

El cromo radiactivo en forma de ión cromato ($^{51}\text{CrO}_4$) penetra rápidamente y marca a los hematíes. Cuando los hematíes marcados con cromo in vitro son inyectados por vía intravenosa, su dilución inmediata proporciona una medida directa y muy exacta de la masa de hematíes total. El subsiguiente ritmo de desaparición de la reactividad es una medida de la vida media del hematíe y las detecciones externas para la radiactividad pueden poner de manifiesto los lugares más importantes de destrucción del hematíe (Fig. 4-2 y Tabla 4-5).

Valores de referencia:

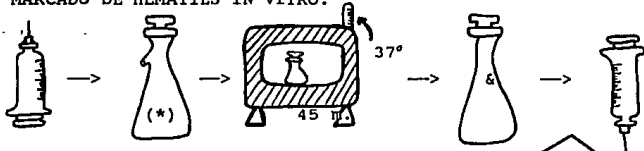
Tiempo de los hematíes marcados con ^{51}Cr = 25 a 32 días. Corresponden a una vida celular hemática comprendida entre 100 y 120 días [99].

Interpretación:

El ritmo de elución del cromo a partir de las células con HbS o HbC se ha encontrado considerablemente superior respecto a las células normales, mientras que el ritmo de elución de los

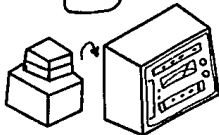
Diagrama de flujo representando el estudio de la vida media de los hematíes por medio de ^{51}Cr .

1) MARCADO DE HEMATIES IN VITRO.



2) TOMAS DE MUESTRAS. DETERMINACIONES.

1.^o día: 30 min. 100 %
 2.^o a 6.^o día: cada 48 hrs.
 7.^o a 30.^o día: cada 4 días



3) DETECCIONES EXTERNAS

Zona Cardíaca
 Zona Hepática
 Zona Esplénica



(*) $\text{Na}_2\text{Cr}^{51}\text{O}_4$: 50 a 100 μC . Act. esp.: 450 mC mg.
 Solución Strumia: citrato sódico, ác. cítrico y dextrosa.
 (&) 100 mg. ác. ascórbico.

Fig. 4-2. Técnica de la cinética del hematíe mediante marcado de los hematíes con cromo radiactivo, mediciones de reactividad de estos hematíes y detecciones externas (Domenech, Setoain y Monné) [18].

hematíes con Hemoglobinas A-S, A-C o HbF son normales. Los hematíes inmaduros (reticulocitos) tienen una afinidad mayor por el ^{51}Cr que las células maduras, dando lugar a un error potencial en la medida de la vida media del hematíe de los pacientes con Anemia Hemolítica. En la enfermedad de la Hb H de las medidas de la vida media pueden ser asimismo erróneas debido a que las 4 cadenas β presentan una afinidad por el cromo mayor que las 2 cadenas β de la Hb A [99].

Tabla 4-5. Detecciones externas usando ^{51}Cr . Principales hallazgos en las Anemias Hemolíticas [99].

TIPO	VIDA MEDIA DEL HEMATIE	CAPTACION ESPLENICA
Anemia hemolítica Esferocítica	Notablemente acortada ↓ ↓ ↓	Elevada ↑ ↑ ↑
AH Autoinmune	Normal o acortada ↓ ○ ↓ ↓	Normal o Elevada ↑
A. Hemolítica de otros tipos.	Acortada ↓ ○ ↓ ↓	Elevada ↑ ○ ↑ ↑

Observaciones:

1) La adición de ácido ascórbico puede alterar hematies con defectos metabólicos intrínsecos, tales como el déficit de G-6-PD. En tales situaciones, el exceso de cromo debe ser extraído mediante el lavado y no mediante la conversión por transformación es ascorbato.

2) El exceso de CrO_4^{2-} tiene un efecto nocivo sobre los hematies. Cuando se añade en proporciones superiores a los 10 a 20 $\mu\text{C.Cr/ml}$ de hematies, la Hb se oxida parcialmente, la glutatión reductasa se inhibe, y la vida media del hematie resulta acortada in vivo.

3) El exceso de ACD (Acido-Citrato-Dextrosa) que es el anticoagulante preferido para el marcaje de células con cromo puede proporcionar una vida media acortada artificialmente, sobre todo en la microsferocitosis congénita y en la Hemoglobinuria Paroxística Nocturna (HPN).

4) La determinación de la vida media con ^{51}Cr también esta enmascarada por el aumento de la incorporación del isótopo por las células jóvenes [99].

4.2.1.2. Determinación de Haptoglobina Sérica.

El nombre de haptoglobina viene del griego haptain (fijar) y globina o fracción proteica de la hemoglobina, se han encontrado grupos con diferencias en la composición de haptoglobinas, considerándoseles como grupo o marcador sérico, y se le denomina por la sigla Hp. La síntesis de Hp tiene lugar en el hígado con una vida media de 2 días, existe en proporción de 1.4 g/l de plasma [18, 54, 99].

Smithies (1955), encontró 3 grupos distintos de haptoglobinas viendo que se trataba de 2 genes alelomorfos y codominantes denominándolos Hp^1 y Hp^2 , con lo cual resultaba 3 fenotipos: Hp 1-1, Hp 2-1 y Hp 2-2 de acuerdo con las bandas en que se separaba en la electroforesis sobre gel de almidón [18, 99]. La molécula de Hp contiene 2 tipos de cadenas (α y β), y las variantes de la primera son las que condicionan los grupos fundamentales de las Haptoglobinas, la cadena β no variará en estos tipos.

La función de esta proteína es la de unirse irreversiblemente con los dímeros de Hb, formando el complejo Haptoglobina-Hemoglobina (Hp-Hb) que no pasa por el filtro renal. Este complejo resultante impide la excreción renal de Hb plasmática y estabiliza la ligadura del heme y la globina, y con ello evita unas pérdidas que serían pequeñas pero constantes por la orina. No obstante cuando el nivel de Hb sérica alcanza cifras superiores a los 125 mg/100ml aproximadamente, ya pasa a la orina [18, 38, 54]. Cuando la Hp es eliminada como el complejo Hp-Hb su concentración en el plasma disminuye con la hemólisis [56, 99].

Se emplean algunas técnicas para medir la cantidad de haptoglobina presente en el plasma, entre éstas se incluyen las técnicas químicas, filtración en gel de Sephadex o Inmunodifusión radial, así como técnicas electroforéticas en papel, gel de almidón, gel de poliacrilamida y más recientemente en gel de agar [99].

Fundamento (Owen y col. 1960) [56, 99]:

Las haptoglobinas del suero se combinan con metahemoglobina (MetaHb) para formar un complejo Hp-MetaHb, que se mide a través de su efecto catalizador (de tipo peroxidasa) sobre la oxidación del guayacol por el peróxido de hidrógeno, para dar tetraguayacol. La cantidad de Hp se expresa en términos de MetaHb.

Material:

Tubos de ensaye de 13 x 100 mm.

Pipetas serológicas de 1, 2 y 5 ml.

Gasas

Baño de incubación a 25°C con tapa (Serial No. A 16145).

Termómetro (0 a 100°C).

Espectrofotómetro (Bausch & Lomb Spectronic 20).

Celdas con 1 = 1 cm.

Gradillas metálicas para tubos de 13 x 100 mm.

Material Biológico:

Suero del paciente.

Mezcla de sueros frescos normales.

Reactivos (Anexo 1):

Cloruro sódico 0.15 M.

Soln de MetaHb.

Reactivo de Guayacol.

H₂O₂ 0.05 M.

Método [56, 99]:

Diluir 0.5 ml de suero fresco del paciente con 2 ml de solución salina y colocar 1 ml de la dilución del suero en 2 tubos, rotularlos como P (problema) y B (blanco).

En el tubo P adicionar 1 ml de la solución de MetaHb y en el tubo B 1 ml de agua destilada.

Simultáneamente preparar las diluciones correspondientes de la mezcla de sueros para la curva de calibración (C.C.).
 Serie A: Preparación de la C.C. (mezcla de sueros) (volumen en ml)

-TUBOS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
-Soln. MetaHb.	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
-Mezcla sueros.	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
-SSF.	1.0	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0

Volumen total: 2 ml para cada sistema.

Serie B: Preparar los siguientes sistemas:

-TUBOS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	P	B	Bc
-Reactivo de Guayacol (ml)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

Mezclar e incubar a 25°C/10 minutos. Es indispensable tapar los sistemas.

De las diluciones B, P y de la C.C. adicionar 0.1 ml de cada una a los correspondientes tubos puestos en el baño de agua a 25°C. El tubo Bc recibe 0.1 ml de SSF.

Añadir 1 ml de peróxido de hidrógeno, inmediatamente mezclar. incubar durante 8 min.

Leer las D.O. a 470 nm. Para la curva de calibración ajustar con el tubo Bc a cero de absorbancia y leer la serie de C.C. - Ajustar nuevamente con el tubo B y leer el tubo P.

Las lecturas se registran gráficamente frente a la cantidad de suero de c/u de los tubos de la C.C. Interpolar la D.O. del tubo P.

El punto de inflexión de la curva obtenida, a partir del cual ésta se hace plana, indica la cantidad de mezcla de suero no diluido que fija toda la MetaHb presente, puesto que la adición de más suero no significa influencia alguna en las lecturas. La lectura en este punto corresponde a una capacidad de fijación de MetaHb de 50 mg/dl.

Debido a que el suero problema se diluye 1:5, las lecturas corresponden a un contenido de Hp de 250 mg/dl (MetaHb) (Fig. 4-3).

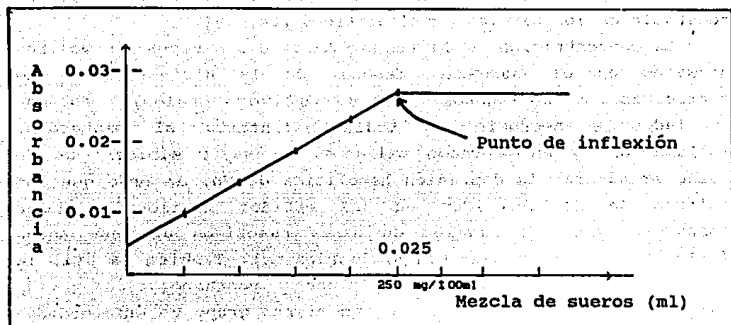


Fig. 4.3. Curva de calibración para las Haptoglobinas.

Valores de referencia:

La concentración media de Haptoglobina en suero expresada como MetaHb fijada es de: 100 mg/100 ml.

Intervalo: 30 a 200 mg/100ml [18, 56, 99].

Interpretación:

Los niveles de haptoglobina son fisiológicamente bajos en recién nacidos de hasta un mes, edad a la que se alcanzan niveles adultos. Hay depleción adquirida de Hp en la enfermedad hepatocelular aguda y crónica, casos raros de haptoglobinemia congénita, hemólisis intravascular y extravascular aguda y crónica, reacción hemolítica de transfusión sanguínea y hemorragia tisular. La Hp disminuye rápidamente en respuesta a cantidades incluso pequeñas de lisis intravascular (lisis de 10 ml de hematíes disminuye el nivel, en unos 100 mg/dl, deprimiéndolo así hasta una concentración de casi cero). Después de un episodio hemolítico el nivel mínimo de Hp se alcanza unas 8 horas más tarde. Aunque no haya más hemólisis el nivel de Hp continúa deprimido durante varios días porque pueden ser

necesarias hasta 2 semanas para que la síntesis hepática reestablezca los niveles prehemolíticos [84, 99].

La concentración de Hp aumenta hasta 6 a 8 veces los valores normales en el embarazo, después de la administración de esteroides y andrógenos (anticonceptivos orales), estados asociados a necrosis de tejidos (infarto al miocardio, inflamación) y en procesos malignos. La mayor síntesis de Hp puede enmascarar la depresión hemolítica de Hp, de modo que los valores de Hp obtenidos en los estados mencionados deben compararse con los niveles de otros reactivos de fase aguda (α -1-antitripsina o α -1-antiquimiotripsina). También es útil la comparación de niveles prehemolíticos y posthemolíticos de Hp [84]. La variabilidad de valores en cierto grupo de enfermedades como en hiperesplenismo y anemia megaloblástica puede estar relacionada a los sitios particulares de destrucción de hematíes y el grado variable de liberar la hemoglobina intravascular [54].

Observaciones:

- 1) Los sueros no deben estar hemolizados.
- 2) Toda la cristalería utilizada debe ser completamente libre de hierro.
- 3) La solución de peróxido de hidrógeno al 0.05 M debe conservarse en el refrigerador en un frasco de plástico.
- 4) El color desarrollado durante la reacción (tetraguayacol) disminuye lentamente si se expone a la luz, por lo que la tapadera de baño debe estar cerrada durante el desarrollo de la coloración y los tubos deben de ser guardados en la oscuridad hasta la realización de las lecturas [18, 56].

4.2.1.3. Determinación de Hemopexina (Hx) Plasmática (Mancini, Fahev y Mackelwey, 1965).

La disociación de Hp plasmática libre puede originar grupos metaheme libres que se unen a una β -globulina específica: La Hemopexina (Hx). Esta es sintetizada en el hígado y tiene una menor afinidad de unión a la hemoglobina que las haptoglobinas,

Su concentración está reducida en los desórdenes hemolíticos [32].

El complejo molecular hemopexina-metaheme también es aclarado por el Sistema Reticulo Endotelial. Cuando la hemopexina está saturada por completo se forma otro complejo proteico denominado metahemalbúmina [50, 99].

Fundamento [76]:

Los niveles de Hx plasmática se determinan por el método de Inmunodifusión Radial (IDR). En la prueba de IDR, uno de los reactantes, por lo común el anticuerpo (anti-Hx humana) es uniformemente distribuido en una capa de gel de agar o agarosa, mientras que el otro reactante, usualmente el antígeno (Hemopexina) se introduce en concavidades circulares practicadas en gel. El antígeno difunde en forma radial en la mezcla gel-anticuerpo, formando un anillo visible de precipitado en un punto que depende de la estequiometría antígeno-anticuerpo. A medida que difunde hacia afuera el antígeno, el anillo de precipitación se disuelve en exceso de antígeno y reaparece en una distancia mayor de la concavidad. Este incremento en el diámetro del anillo de precipitado continúa con el tiempo hasta que el antígeno y anticuerpo alcanzan el equilibrio. En el equilibrio el diámetro del disco es directamente proporcional a la cantidad de antígeno originalmente colocado e inversamente proporcional a la concentración de anticuerpo. Los resultados obtenidos con las muestras deben compararse con los de la curva estándar que se incluyen en cada corrida (Fig. 4-4).

Valor de referencia:

50 a 100 mg/100 ml [80].

Interpretación:

Los valores de Hx en lactantes se aproximan a los valores de los adultos al finalizar el primer año de vida. En las enfermedades hemolíticas no sólo se remueve del plasma haptoglobina si no también hemopexina asociadas a grandes concentraciones del heme en las anemias hemolíticas hereditarias,

La disminución es más marcada en talasemia mayor, y no tan pronunciada en talasemia drepanocítica o enfermedad de este último tipo. La concentración de hemopexina mejora (pero no se normaliza) después de la esplenectomía.

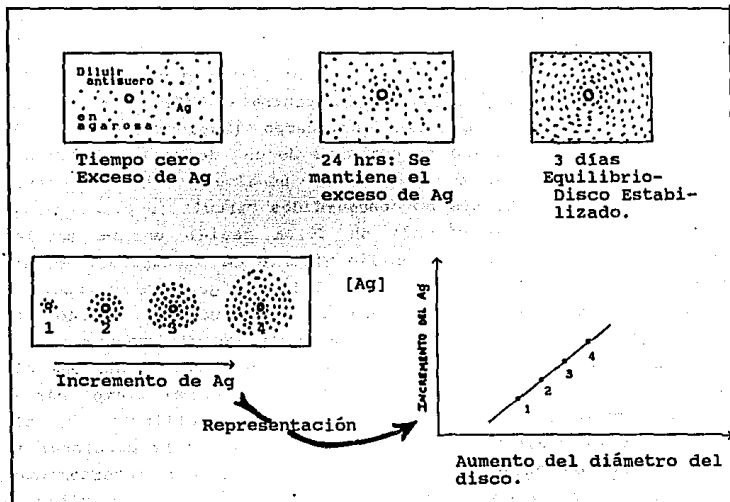


Fig. 4-4. Representación esquemática de Inmunodifusión Radial [76].

Como los episodios hemolíticos incluso menores provocan depleción de la concentración plasmática de haptoglobina, la evaluación de la menos lábil concentración plasmática de hemopexina puede ofrecer una prueba apropiada para hemólisis crónica [84].

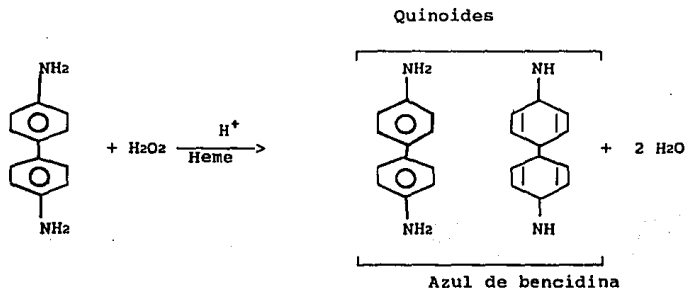
4.2.2. Pruebas para Determinar Hemólisis Intravascular.

4.2.2.1. Determinación de Hemoglobina en el Plasma. (Naumann, H.N. 1964)

El proceso de destrucción de hematíes particularmente en estados patológicos puede tener lugar a través de 2 vías y el proceso no es usualmente del todo intra o extravascular. El punto final es casi siempre extravascular como el resultado de la acaparación del previo daño a las células por el sistema reticuloendotelial. La descomposición catabólica de la Hb en este sitio resulta de la conversión del 65 al 80% del heme a bilirrubina [32]. Normalmente existe escasa cantidad de hemoglobina en el plasma, pero cuando hay un proceso hemolítico puede aumentar, si bien pronto se transforma a bilirrubina [18].

Fundamento [89]:

El método se basa en la propiedad química de la hemoglobina de catalizar la rápida oxidación de ciertas diaminas aromáticas por peróxido de hidrógeno. La amina que se usa más comúnmente es la bencidina. Esta amina se oxida a una serie de formas quinoides y que inicialmente tienen color verde a negro azulado, pero que con el transcurso del tiempo se transforman en color rojo, que es el color más estable para medirse espectrofotométricamente a 500 nm.



Material:

Tubos de ensayo de 15 x 150 mm.

Gradillas metálicas para tubos de 15 x 150 mm.

Pipetas serológicas de 10 ml.

Pipetas serológicas de 1 ml (1/100).

Espectrofotómetro (Bausch & Lomb Spectronic 20).

Celdas 1 = 1 cm.

Gasas .

Material Biológico:

Sangre completa.

Reactivos (Anexo 1):

Reactivo de bencidina al 1% p/v en ácido acético.

Peróxido de hidrógeno al 3% v/v.

Estándar de hemoglobina 0.5 mg/100 ml.

Testigo de bencidina.

Acido acético glacial al 20% v/v.

Método [89]:

Obtener el plasma y centrifugar 3 veces a 5000 rpm/10 min.			
Diluir 1 ml del plasma con 2 ml de agua destilada, mezclar y seguir el procedimiento:			
TUBOS	B	S	T
Plasma diluido (ml)	0.25	0.25	0.25
H ₂ O ₂ 3% (ml)	0.25	0.25	--
MEZCLAR BIEN Y DEJAR EN REPOSO DURANTE 10 MINUTOS (*)			
Testigo bencidina (ml)	0.50	--	0.50
Std. de hemoglobina (ml)	--	0.50	--
H ₂ O ₂ 3% (ml).	--	--	0.25 (**)
AGITAR Y REPOSAR DURANTE 15 MINUTOS			
Acido acético glacial (ml)	10.0	10.0	10.0
Tapar los tubos y mezclar por inversión. Tomar las lecturas de los tubos S y T frente a B (***) . Leer a 500 nm.			

Notas en la siguiente hoja.

Notas del Método.

- (*) Este paso permite corregir por interferencia del plasma, al inhibir selectivamente la reactividad de la hemoglobina del plasma en las mezclas de reacción estándar y testigo.
- (**) Cuando se agrega el H₂O₂ después de la bencidina, ocurrirá la reacción de azul de bencidina.
- (***) Si la absorbancia de la muestra en el sistema T es demasiado alto se repetirá el trabajo con una dilución 1:10 a 1:20 del plasma original.

Cálculo:

En el procedimiento se comparará 0.25 ml de una solución 1:3 de suero con un estándar de 0.50 mg/100 ml, por consiguiente:

$$\begin{aligned} \text{mg Hb en plasma/100 ml} &= \frac{A_T}{A_S} \times \frac{0.50}{0.25} \times 0.50 \times D \\ &= \frac{A_T}{A_S} \times D \end{aligned}$$

Donde:

D = Dilución realizada en el plasma (1:3).

A_r = Absorbancia del problema.

A_s = Absorbancia del estándar.

Valor de referencia:

0.50 a 2.5 mg Hb plasma/100 ml [89].

Interpretación:

La cifra está aumentada en las Anemias Hemolíticas (5 a 65 mg/100 ml), en las que existe cierto grado de hemólisis intravascular; síndromes hemoglobinúricos (20 a 250 mg/100 ml), paludismo, favismo, síndrome de hemólisis por criohemólisin, después de transfusiones mal toleradas (15 a más de varios cientos de mg/100 ml) [18, 89].

En menor cantidad se pueden hallar aumentos en casos de anemias de células falciformes, anemias mediterráneas, por anticuerpos calientes, etc. Siempre debe de considerarse como un signo de hemólisis, si bien cuando esta hemólisis tiene lugar en los sitios normales y sin gran intensidad puede no aparecer

aumento de esta hemoglobina plasmática [18].

Observaciones:

- 1) Toda la cristalería a usar debe estar exenta de hierro.
- 2) Los plasmas deben estar libres de hemólisis.
- 3) Una elevación de 5 a 10 mg da al plasma un color amarillo-naranja. Con un aumento mayor, el color adquiere un tono rosado.
- 4) Debe tenerse cuidado al manejar la bencidina debido a que es un material carcinogénico.
- 5) Las proteínas del plasma inhiben la reacción del rojo de bencidina, en el procedimiento precedente se agrega proteína al estándar (S) de modo que el efecto de inhibición sea idéntico en los tubos estándar y de la muestra desconocida [89].

4.2.2.2. Determinación de Metahemalbúmina del Plasma.

La metahemalbúmina (Mha) en el resultado de la oxidación de la Hb plasmática libre a metahemoglobina (hierro trivalente), la cual se disocia en heme y globina. El heme forma complejos con hemopexina y también con albúmina para formar metahemalbúmina la cual imparte color pardo al suero [84].

La Mha aparece en el término de 5 horas del inicio de la hemólisis intravascular y persiste durante más de 24 horas. En cambio la Hb y la MetaHb suelen eliminarse en 6 a 12 horas. Por consiguiente habría que investigar la presencia de Mha, si se sospecha que unas horas antes se haya producido un episodio de hemólisis intravascular, ej. una reacción post-transfusional [72].

Fundamento (Schumm, 1912) [56]:

Si la concentración de Hb libre en el plasma es tan grande que no puede ser fijada completamente por la haptoglobina, el exceso se transforma en metaheme, y se combina con una albúmina plasmática formando la Mha (o ferrihemalbúmina). Se puede reconocer, la presencia de Mha a través de un hemocromógeno que se produce con el sulfuro de amonio.

Material:

Gasas.

Tapones de plástico.

Tubos de ensayo de 13 x 100 mm.

Espectrofotómetro (Bausch & Lomb Spectronic 20).

Celdas para espectrofotómetro con $l = 1$ cm.

Pipetas serológicas de 1.0 ml.

Pipetas serológicas de 5.0 ml.

Material Biológico:

Sangre completa.

Reactivos (Anexo 1):

Sulfuro de amonio concentrado $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ 20% v/v.

Hidróxido de amonio concentrado (NH_4OH) .

Eter.

Método [56]:

Obtener plasma libre de hemólisis mediante centrifugación a 2500 rpm / 10 minutos.

En un tubo colocar 3.0 ml de plasma fresco. Leer la banda de absorción a 576 nm para investigar la presencia de Hb y a 630 nm para la Mha, (esta última banda puede ser escasa).

Añadir una capa de éter (1 cm).

Añadir 0.3 ml de sulfuro de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ y 3 gotas de amoniaco concentrado.

Agitar y esperar la separación. Leer:

Si hay Mha presente, la banda de 630 nm (roja) desaparecerá y una banda densa de 558 nm (verde) aparecerá. El tubo debe examinarse inmediatamente puesto que al estancarse el sulfuro tenderá a producir sulfohemoglobina con una banda de absorción en los 618 nm.

Interpretación:

- 1) Normalmente no se encuentra presente en el plasma, pero puede detectarse como secuela de un episodio hemolítico cuando hace tiempo que la hemoglobinemia y la hemoglobinuria han desaparecido [80].
- 2) Aparece cuando la Hb ha saturado ya la haptoglobina y la fracción beta-1, en:
 - a) Los procesos con hemólisis intravascular rápida, pero está ausente en la hemólisis extravascular (ictericia hemolítica familiar, talasemia, anemia drepanocítica, etc.).
 - b) Pancreatitis aguda, sobre todo en su forma hemorrágica.
 - c) Embarazo ectópico, escorbuto, trombosis mesentérica, hematoma intra-abdominal y estrangulación intestinal [4].
- 3) Si coexiste insuficiencia hepática y hemólisis intravascular, se eleva notablemente la metahemalbuminemia [4].

4.2.2.3. Determinación de Hemoglobina en Orina.

En diversas circunstancias patológicas puede encontrarse pigmento hemático en la orina, bien porque éste ha sido eliminado directamente por el riñón (hemoglobinuria), debido a destrucción excesiva de hematíes (ictericias hemolíticas), o bien por la destrucción de los hematíes que fueron eliminados por la orina (hematuria sintomática de tumores renales, litiasis, tumores de vías urinarias, etc.) [18].

La hemoglobinuria es consecuencia de un aumento brusco y transitorio en la concentración de la hemoglobina plasmática, que casi siempre se debe a hemólisis intravascular [34]. Cuando el nivel de hemoglobina crece en el plasma sanguíneo (crisis hemolíticas), el glomérulo renal deja pasar hemoglobina, pero el tubo renal es capaz de captarla y transformarla, por una parte, en bilirrubina (que pasa a la sangre), y por otra, en hemosiderina, que en forma de gránulos es eliminada por la orina. Pero cuando la hemoglobinemia sobrepasa el umbral de eliminación de 1.35 g/l de plasma, los tubos renales no son ya capaces de

transformar toda la hemoglobina que ha pasado a través del glomérulo, y aunque parte de esta hemoglobina es transformada, otra parte se elimina sin transformar; así esta hemoglobinuria verdadera se acompaña siempre de una cierta cantidad de hemosiderinuria [18].

Método de las Tiras Reactivas.

Fundamento [84]:

Las pruebas con tiras reactivas de inmersión para hemoglobina en orina se basan en que la hemoglobina actúa como una peroxidasa y cataliza la oxidación de la o-tolidina con peróxido dando color azul.

Material:

Tiras reactivas.

Material Biológico

Orina

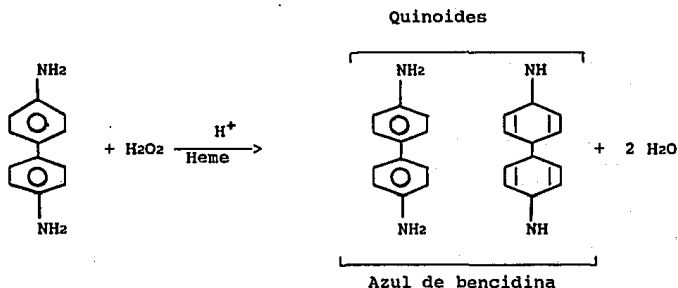
Método [18].

Resuspender el sedimento urinario.
Sumergir una tira reactiva en la muestra biológica.
Sacar la tira y efectuar la lectura por comparación con la escala correspondiente.

Método de Adler (Prueba de la bencidina).

Fundamento [18]:

El método se basa en el poder oxidante del peróxido de hidrógeno sobre la bencidina, cataliza la reacción por la hemoglobina presente. La bencidina es oxidada a una serie de formas que dan la coloración característica a los pocos segundos.



Material:

Tubos de ensaye de 13 x 100 mm.

Pipetas serológicas de 2.0 ml.

Gradillas metálicas para tubos de ensaye de 13 x 100 mm.

Material Biológico:

Orina.

Reactivos (Anexo 1):

Bencidina (r.a.).

H₂O₂ de 12 volúmenes.

Acido acético.

Método [18]:

Colocar en un tubo de ensaye 0.10 g de bencidina (r.a.) más 2.0 ml de ácido acético. (corresponde a una solución saturada).

Añadir 10 gotas de H₂O₂ de 12 volúmenes.

Adicionar 4 gotas de orina resuspendida.
En caso positivo aparecerá una coloración azul verdosa y más o menos intensa a los pocos segundos.

Informe de resultados:

Negativo.

Interpretación:

Después de un episodio hemolítico intravascular se excreta hemoglobina en la orina si se excede la capacidad ligadora de haptoglobina sérica (100 a 200 mg/dl de Hb). La Hb excretada en la orina se reabsorbe y se cataboliza en las células túbulorrenales hasta exceder su umbral (90 a 100 mg/dl) con la aparición de Hb libre en la orina (hemoglobinuria) [84].

La hemoglobinuria suele deberse a hemoglobinemia por accidente hemolítico intravascular, a veces es causada por desintegración de los hematíes dentro de las vías urinarias, generalmente en la vejiga [56].

4.2.2.4. Determinación de Hemosiderina en Orina.

Cuando los hematíes dejan escapar hemoglobina, ésta es desdoblada por ciertas regiones de la mitocondria (siderosomas) de las células (sobre todo los histiocitos) en hematoidina (hemoglobina sin hierro) y hemosiderina (hemoglobina con hierro). Este último compuesto contiene hidróxido férrico (Fe(OH)₃) unido a una proteína (ferritina) [56].

Desde el momento en que los hematíes dejan escapar la hemoglobina hasta que aparece la hemosiderina, pasan de 2 a 3 días. La hemosiderina (Hs) es un pigmento granuloso, pardo

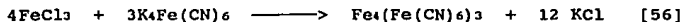
amarillento o dorado; es insoluble en álcalis, pero es soluble en ácidos. Después de la fijación en soluciones de formaldehído, se disuelve lentamente en los ácidos diluidos; por lo tanto, la fijación con formol en suero fisiológico puede, después de un tiempo, producir la desaparición completa de los depósitos de hemosiderina, con excepción de los mayores [56].

Fundamento [56]:

(Modificación de Gomori a la reacción de Perls del azul de prusia para la hemosiderina).

La hemosiderina puede ser captada por las células del epitelio tubular renal, que se cargan con hierro, descamándose posteriormente en la orina donde pueden ser descubiertas por tinción del sedimento urinario mediante la reacción del azul de Prusia (siderinuria) [102].

El método se fundamenta en la combinación del hierro inorgánico con el ferrocianuro de potasio en solución ácida para formar ferrocianuro férrico (Azul de Prusia):



Material:

Portaobjetos.

Cubreobjetos.

Centrífuga (Modelo J-12).

Tubos de ensaye de 13 x 100 mm.

Gradilla metálica para tubos de ensaye de 13 x 100 mm.

Pipetas serológicas de 5.0 ml.

Microscopio óptico (Binocular Rossbach).

Guantes.

Material Biológico:

Orina.

Reactivos (Anexo 1):

Colorante azul de prusia.

Ferrocianuro de potasio al 2.0%.

HCl al 1.0%.

Método del portaobjetos [56]:

Centrifugar una muestra de orina de la mañana a 2000 rpm / 5 min.
Decantar el sobrenadante.
Colocar una gota del sedimento urinario en un portaobjetos y añadir una gota del colorante azul de prusia.
Mezclar bien y colocar un cubreobjetos.
Observar al microscopio con objetivo seco fuerte (40x).
Examinar la presencia de gránulos negros o azules, aislados o dentro de las células epiteliales o de cilindros, o como detritos amorfos.

Método del tubo [56]:

Centrifugar una muestra de orina (la primera de la mañana) a 2000 rpm/5 min.
Decantar sobrenadante.
Examinar con el microscopio varias gotas del sedimento buscando gránulos marrones toscos sobre todo dentro de las células epiteliales.
Si se observan estos gránulos, suspender el resto del sedimento en una mezcla reciente de 5.0 ml de ferrocianuro potásico al 2.0% y 5.0 ml de HCl al 1%.
Dejar reposar durante 10 min.
Centrifugar a 2000 rpm/ 5 min.
Decantar sobrenadante y examinar el sedimento con el objetivo 40x en el microscopio.
Los gránulos toscos de hemosiderina aparecen azules en esta preparación.
Si no se tifien los gránulos, volver a examinar después de 30 min.

Interpretación:

La hemosiderina aparece en el sedimento urinario en las enfermedades que producen una auténtica siderosis del parénquima renal, ej. anemia perniciosa, anemia hemolítica crónica, anemia microangiopática hemolítica, pacientes politransfundidos, hemoglobinuria paroxística nocturna y hemocromatosis [34].

4.2.3. Pruebas para Determinar Enfermedad Hemolítica Inmune.

4.2.3.1. Anemias Hemolíticas Inmunes.

La anemia hemolítica inmune (AHI) esta definida por la supervivencia acortada del hematíe mediada a través de la respuesta inmune, específicamente por anticuerpos humorales [69]. Los tipos de anemia hemolítica se clasifican por el tipo de anticuerpo producido durante la respuesta inmune (tabla 4-6).

Tabla 4-6. Clasificación de las Anemias Hemolíticas Inmunes [69].

- | |
|---|
| <p>I. Anemias Hemolíticas Isoinmunes.</p> <ul style="list-style-type: none">A) Reacciones Hemolíticas de Transfusión.B) Enfermedad Hemolítica del Recién Nacido. <p>II. Anemias Hemolíticas Autoinmunes.</p> <ul style="list-style-type: none">A) Anticuerpos tipo caliente.B) Anticuerpos tipo frío. <p>III. Anemias Hemolíticas Inmunes Inducidas por Drogas.</p> <ul style="list-style-type: none">A) Mecanismo por haptenos.B) Formación de complejos inmunes.C) Inducción de Acs asociada con la administración de medicamentos. |
|---|

Mecanismos de destrucción de hematíes:

La destrucción de los hematíes tanto en la anemia hemolítica isoimmune y autoimmune se lleva a cabo por uno de dos mecanismos principales. Los anticuerpos IgM generalmente causan la destrucción intravascular inmediata de hematíes sensibilizados o su secuestro por el hígado. En contraste, los anticuerpos IgG facilitan el secuestro de hematíes sensibilizados por el bazo y su destrucción extravascular en este sitio. Estos mecanismos básicos son ilustrados por anticuerpos anti-A, anti-B y anti-Rh [101].

4.2.3.1.1. Anemias Hemolíticas Isoimmunes.

La isoimmunización es el proceso mediante el cual el sistema inmune de un individuo es estimulado por un antígeno extraño con la producción del correspondiente anticuerpo. El anticuerpo producido por esta respuesta inmune es denominado "isoanticuerpo". El anticuerpo recubre a los hematíes extraños introducidos dentro de la circulación, resultando una hemólisis. La hemólisis debida a isoanticuerpos es producida a través de dos procesos [69, 77]:

- A) Reacciones hemolíticas de transfusión.
- B) Enfermedad hemolítica del recién nacido.

A) Reacciones Hemolíticas de Transfusión:

- 1) Inmediatas (agudas)
 - i) Reacciones ABH.
 - ii) Reacciones Rh.
 - iii) Reacciones ante otros antígenos de los hematíes.
- 2) Tardías.

1) *Reacciones hemolíticas transfusionales Inmediatas.*

Están caracterizadas por hemólisis intravascular aguda y más comúnmente asociadas con isoanticuerpos IgM ABH, los cuales activan complemento.

El proceso de hemólisis es iniciado por la unión del isoanticuerpo del paciente al correspondiente antígeno del hematíe del donador, el cual activa la cascada del complemento hasta su término, causando lisis intravascular de los hematíes transfundidos. El tipo inmediato de reacción de transfusión es el más comúnmente asociado con incompatibilidades ABH. Estas reacciones son severas debido a la naturaleza potente anti-A o anti-B IgM circulantes en el plasma de los pacientes al momento de la transfusión [69].

2) Reacciones hemolíticas transfusionales Tardías (RHTT).

Resulta de una respuesta secundaria a la transfusión de antígenos de los hematíes. Esto ocurre previamente en pacientes sensibilizados en los cuales el nivel de isoanticuerpos es suprimido al punto de ser indetectable, después de una estimulación inicial. La mayoría de los casos de RHTT, los anticuerpos implicados en estas reacciones son inmunoglobulinas IgG y son usualmente demostrables en el suero de los pacientes en las próximas 48 hrs. después de la transfusión, alcanzando un nivel máximo al cabo de 6 días. Este tipo de reacción es llamada "Tardía", debido a que da tiempo a que el paciente produzca niveles incrementados de anticuerpos IgG que ataquen y destruyan los hematíes transfundidos [69, 77].

B) Enfermedad Hemolítica del Recién Nacido (EHRN).

La eritroblastosis fetal es una enfermedad isoimmune. El anticuerpo es elaborado por la madre contra el antígeno presente en las células fetales, pero no en sus propias células. Esto ocurre cuando las células fetales que son portadoras del antígeno se introducen en la circulación materna. Entonces, si el anticuerpo es capaz de atravesar la placenta, se une a los hematíes fetales y acorta su supervivencia [34, 69, 77, 85, 86].

La enfermedad hemolítica del recién nacido debida a incompatibilidad de Rh es consecuencia habitualmente de los siguientes hechos:

- a) El feto recibe del padre el antígeno D, antígeno que la madre no posee.

b) La madre ha sido sensibilizada previamente frente al antígeno D por un embarazo anterior o por exposición a productos sanguíneos.

A causa de ello, produce un anticuerpo anti-D de tipo IgG, en respuesta al estímulo antigénico de memoria que supone el paso de una cantidad mínima de hematíes a través de la placenta durante el embarazo.

c) Puesto que los hematíes maternos no poseen el antígeno D, no reaccionan con el anticuerpo. Sin embargo, el anticuerpo IgG cruza la placenta y reacciona con los hematíes fetales, con la consiguiente hemólisis (Fig. 4-5) [22, 69, 72, 97].

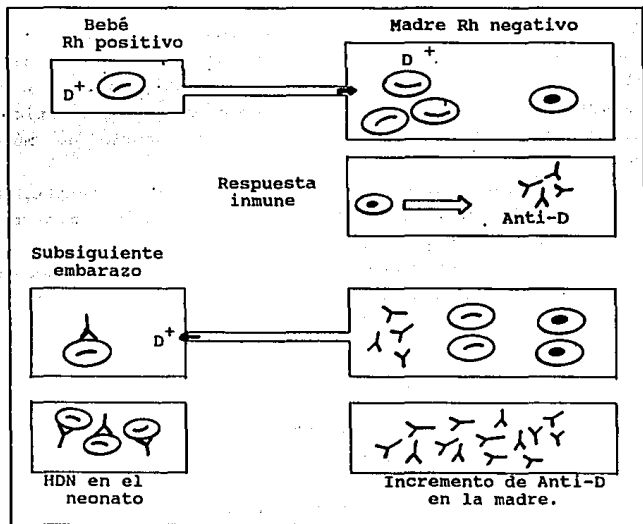


Fig. 4-5. Enfermedad Hemolítica del Recién Nacido [69].

4.2.3.1.2 Anemias Hemolíticas Autoinmunes.

La Anemia Hemolítica Autoinmune (AHAI) representa una anomalía del sistema inmune, en donde la habilidad para el reconocimiento propio de antígenos propios de un individuo es baja. Como resultado, los pacientes destruyen sus propios hematíes por la producción de autoanticuerpos, los cuales se unen a los eritrocitos del paciente, induciendo la hemólisis [8, 15, 69].

La Enfermedad Hemolítica Autoinmune se caracteriza por una velocidad aumentada de destrucción de los propios hematíes del paciente y de los hematíes normales que le son transfundidos; la aceleración de la hemólisis está mediada por uno o más mecanismos involucrando componentes del sistema inmune [34, 69, 99].

Las características de este grupo de enfermedades son por lo tanto:

- 1) Vida media del hematíe disminuída in vivo.
- 2) Evidencia de "Autoinmunidad", dirigida contra los hematíes, usualmente demostrado por una prueba de antiglobulina directa (PAD) positiva, frente a los hematíes del paciente, o a la existencia en el suero del paciente de un autoanticuerpo contra el hematíe, demostrable por una serie de métodos serológicos o ambos.
- 3) Evidencia de incremento en la producción de sangre, como respuesta al proceso hemolítico, en los pacientes cuya médula ósea es capaz de esta respuesta [16, 26, 82].

Estas anemias son convenientemente clasificadas de acuerdo a las propiedades térmicas de los anticuerpos contra los hematíes en cuestión:

A) AHAI tipo caliente.

Se produce por autoanticuerpos IgG en cerca del 90% de los pacientes, este trastorno puede ser idiopático (con desarrollo de hemólisis persistente sin signo alguno de afecciones subyacentes) o secundario (enfermedades que se acompañan de alteración de la reactividad inmunológica) [55, 72].

Mecanismo de Hemólisis:

La incubación de los autoanticuerpos IgG tipo caliente con hematíes in vitro no parece ocasionar alteración alguna en éstos. Sin embargo, si dichos hematíes, que han quedado recubiertos por la IgG, se transfunden a un sujeto, son eliminados rápidamente de la circulación [72, 101]. Los hematíes así tratados se adhieren a los macrófagos en el bazo, hígado y médula ósea, los cuales poseen receptores en su membrana para el fragmento Fc de la IgG. Estas células pueden fagocitar la totalidad del hematíe o fragmentos de su membrana; lo último da lugar a la formación de esferocitos, que son fagocitados con más facilidad por los macrófagos, especialmente en el bazo [72].

Si puede fijarse la suficiente cantidad de anticuerpo a los lugares antigénicos para formar dobletes, los autoanticuerpos IgG de tipo caliente pueden fijar asimismo el complemento sobre la membrana del hematíe. Esta clase de autoanticuerpos raras veces activan la secuencia total del complemento, con la consiguiente hemólisis intravascular, pero pueden ocasionar la fijación de C3b a la membrana del hematíe.

Los hematíes recubiertos de IgG y C3b se adhieren a los receptores Fc y C3b de los macrófagos, por lo que son fagocitados con mayor facilidad que los que se hallan recubiertos solamente por IgG [69, 72].

Los hematíes recubiertos ligeramente por IgG son eliminados por los macrófagos esplénicos. En cambio, los hematíes intensamente recubiertos por IgG y C3b simultáneamente, son eliminados preferentemente por las células de Kupffer, debido a que el flujo sanguíneo del hígado sobrepasa ampliamente el de el bazo [72].

El estado funcional del sistema fagocitario mononuclear influye sobre la gravedad de la hemólisis. Los procesos que activan los macrófagos (infecciones), intensifican la hemólisis. A medida que aumenta el número de hematíes destruidos en el bazo, incrementa su tamaño, originando un enlentecimiento aún mejor del paso de los hematíes a través del bazo, con lo que aumenta el atrapamiento de los hematíes y su fagocitosis por los macrófagos [69, 72, 101].

B) AHA1 tipo frío.

Algunos anticuerpos reaccionan más eficientemente con los antígenos de los hematíes a temperaturas inferiores a 32°C y son llamados "anticuerpos reactivos fríos". Los autoanticuerpos fríos patológicos están divididos en los siguientes tipos:

1) Síndrome de Aglutininas Frías (Enfermedad hemolítica autoinmune idiopática por el frío) [9].

Mecanismo de Hemólisis:

Los anticuerpos IgM de reacción en frío producen hemólisis a través de la siguiente secuencia de hechos:

- a) Al pasar la sangre por las zonas más frías del cuerpo el anticuerpo IgM se une a los antígenos de la membrana del hematíe, llevando consigo a C1q hasta la membrana.
- b) Al volver los hematíes a otras regiones del organismo con mayor temperatura, el anticuerpo IgM se separa de la membrana del hematíe, pero se desencadena sobre ésta la activación del complemento.
- c) Si se han depositado grandes cantidades de C1q sobre los hematíes como ocurre cuando la temperatura del organismo disminuye, la activación del complemento puede progresar hasta la formación del complejo de ataque a la membrana (CAM: C5b'6'7'8'9), con la consiguiente hemólisis intravascular.
- d) Si, como es habitual, se deposita una menor cantidad de C1q sobre los hematíes, la activación del complemento se interrumpe con la unión de C3b a su membrana.
- e) A los hematíes recubiertos con C3b pueden ocurrírles:
 - i) Sufrir hemólisis por adherencia de C3b a los macrófagos y subsiguiente fagocitosis. Debido al elevado flujo sanguíneo hepático, ésto ocurre principalmente en las células de Kupffer.
 - ii) Que el factor I de la secuencia del complemento puede desdoblarse al C3b existente sobre la superficie de los hematíes, con formación de C3d. Aunque éste permanece unido a la membrana del hematíe los macrófagos no poseen receptores para C3d, por lo cual los hematíes se escapan de la hemólisis [69, 72, 101].

2) Enfermedad hemolítica autoinmune secundaria por el frío (autoanticuerpos fríos relacionados con infección).

El autoanticuerpo frío es una inmunoglobulina IgM con características de especificidad anti-I. Se ha reportado que la autoaglutinina fría producida en la infección por Mycoplasma pneumoniae es un respuesta inmunológica a los anticuerpos micoplasmiales y este anticuerpo reacciona cruzadamente con el antígeno eritrocitario I existente sobre la membrana del hematíe. Los hematíes son nuevamente sensibilizados con componentes del complemento debido al autoanticuerpo frío producido, el cual es liberado por la infección particular. Si la cascada del complemento no procede a C₉ (las células mueren por lisis), los macrófagos del sistema retículo endotelial pueden liberar constantemente a los hematíes sensibilizados a través de sus receptores de los fragmentos C_{3b} y por lo tanto causar hemólisis [15, 69, 72,].

3) Hemoglobinuria Paroxística por el frío.

A diferencia de las aglutininas frías IgM postinfecciosas, que poseen especificidad para el sistema antigénico Ii, el anticuerpo frío de tipo IgG tiene especificidad para el sistema antigénico P de la membrana de los hematíes [72].

La destrucción celular es debida a un anticuerpo frío llamado " autohemolisinas " , la cual se une a los hematíes del paciente a temperaturas bajas y fija complemento. La hemólisis ocurre cuando la temperatura del cuerpo alcanza 37°C y las células sensibilizadas sufren lisis intravascular mediada por el complemento. Característicamente esta aglutinina fría es un anticuerpo IgG con actividad "bifásica" llamada hemolisina bifásica (anticuerpo de Donath-Landsteiner) [15, 69, 95].

4.2.3.1.3. Anemias Hemolíticas Inmunes Inducidas por Drogas.

Las anemias hemolíticas inducidas por drogas son ejemplos de enfermedades en las cuales la exposición de antígenos extraños causa destrucción de las propias células de los individuos sensibilizados [15, 101].

Los estados inmuno-hemolíticos desencadenados por medicamentos, comprenden 3 mecanismos en los cuales el medicamento o la droga desempeña diferentes papeles:

A) Mecanismo por haptenos:

El medicamento aparece en combinación como un componente de la membrana del hematíe. La presencia del fármaco induce la formación de un anticuerpo, casi siempre del tipo IgG, frente a dicho medicamento. En una exposición subsiguiente al fármaco este anticuerpo interactúa con los hematíes que se han cubierto de nuevo de medicamento. La presencia del anticuerpo sobre los hematíes se revela con la prueba antiglobulínica directa positiva [99]. Las drogas implicadas en esta respuesta incluyen las penicilinas y raramente las cefalosporinas y estreptomycinas (Fig.4-6) [15, 69 99].

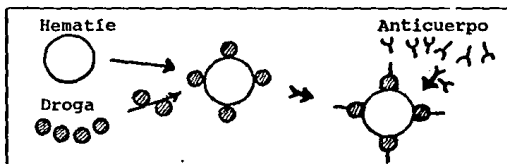


Fig. 4-6. Mecanismo de absorción de fármacos [69].

B) Formación de complejos inmunes:

En este mecanismo, el fármaco probablemente formando complejo con un portador, desencadena también una respuesta inmune, generalmente del tipo IgM. La administración subsiguiente

del medicamento da como resultado la formación de complejos fármaco-anticuerpo que son capaces de interactuar con las membranas de los hematíes, ligando a ellas componentes del complemento por mecanismos aún no bien conocidos. El complejo fármaco-anticuerpo se disocia dejando al hematíe reactivo a la prueba antiglobulínica con anti-complemento [99]. Los fármacos más comúnmente involucrados en esta respuesta incluyen a la quinidina, fenacetina, estibofeno, tiazida, sulfonamidas, ácido p-aminosalicílico, entre otros [15, 69 99] (Fig. 4-7).

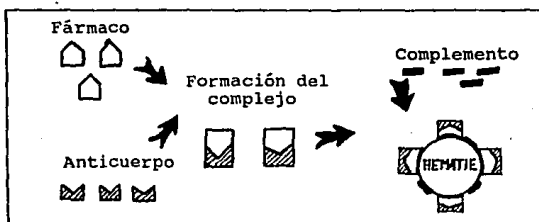


Fig. 4-7. Mecanismo por complejos inmunes [69].

C) Inducción de anticuerpos asociada con la administración de medicamentos.

Este es un mecanismo de hemólisis inmune relacionado con medicamentos. Su notabilidad estriba en que, al parecer el fármaco o sus metabolitos no son componentes necesarios en la reacción inmunológica con los hematíes, es decir, no precisa estar presente para mediatizar la interacción de los hematíes con los anticuerpos en los ensayos in vitro [99]. Los fármacos implicados en esta respuesta incluyen α -metildopa y drogas relacionadas (L-dopa, ácido mefenámico, etc.) (Fig. 4-8) [15, 69, 99].

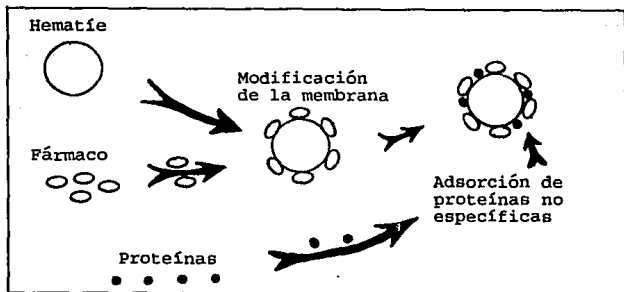


Fig. 4-8. Mecanismo por modificación de la membrana [69].

4.2.3.2. Prueba de Antiglobulinas de Coombs.

Los trastornos autoinmunitarios son identificados por una prueba de Coombs (antiglobulina) positiva que indica la adherencia de la inmunoglobulina o del complemento a la superficie del hematíe. Una envoltura de IgG sola puede llevar a la fagocitosis por las células reticuloendoteliales, las cuales reconocen los sitios específicos en el fragmento Fc de la cadena pesada de IgG. La IgG y la IgM también pueden fijar el complemento a la membrana del hematíe, cuando ocurre ésto, la prueba de Coombs es positiva solamente cuando el suero con antiglobulina contenga anticuerpos contra C₃, C₄ o ambos [2, 38].

4.2.3.2.1. Prueba Directa de Coombs.

Fundamento [15, 26, 30]:

A una suspensión de hematíes del paciente se agrega el suero de Coombs (antiglobulina humana), cuando dichos hematíes contienen en sus membranas los anticuerpos aglutinantes

específicos, la adición del suero de Coombs provoca una aglutinación visible como se indica en la Fig. 4-9, pero al no haber tales anticuerpos, no ocurre la aglutinación de los hematíes del paciente.

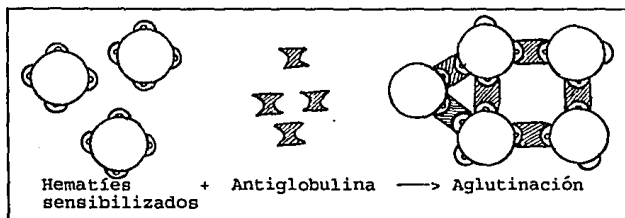


Fig. 4-9. Representación esquemática de la prueba de la antiglobulina directa. Al enfrentar los hematíes sensibilizados a un suero antiglobulina, ésta se fija a los anticuerpos produciéndose puentes de unión que se visualizan como una aglutinación macroscópica [15].

Material:

Tubos de ensayo de 13 x 100 mm.

Tubos de ensayo de 10 x 75 mm.

Gradillas metálicas para tubos de 13 x 100 mm. y 10 x 75 mm.

Pipetas Pasteur.

Pipetas serológicas de 1 ml.

Centrífuga (mod. J-12).

Baño de incubación a 37°C.

Termómetro (escala de 0° a 100°C).

Material Biológico:

Suspensión de hematíes del paciente al 2.0%.

Reactivos (Anexo 1):

Suero de Coombs (antiglobulina humana).

Solución Salina Fisiológica al 0.85% (SSF)

Método [34]:

Colocar 1 ml de sangre anticoagulada en un tubo de ensaye de 13 x 100 mm. y adicionar 5ml de SSF al 0.85%.
Mezclar y centrifugar a 1500 rpm / 1 min. para concentrar los hematíes.
Decantar el sobrenadante lo más completamente posible. Repetir los lavados 3 veces, retirando cada vez todo el sobrenadante. El lavado deberá realizarse inmediatamente y sin interrupción.
Preparar una suspensión de hematíes al 2.0% en medio salino.
En un tubo de ensaye de 10 x 75 mm colocar 0.1 ml de suero antiglobulina humana, añadir 0.1 ml de la suspensión de hematíes al 2.0% y mezclar perfectamente.
DEJAR REPOSAR DURANTE 5 MIN.
CENTRIFUGAR POR UN MIN. A 1500 rpm.
Resuspender el botón de hematíes y comprobar macro y microscópicamente si hay aglutinación. Incluir controles sin los cuales la prueba no tiene validez.

Preparación de los controles:

Control positivo:

Preparar una suspensión de hematíes Rh positivo normales al 2% en SSF al 0.85%.
Colocar en un tubo de ensaye de 10 x 75 mm 0.1 ml de suero anti-D y diluir con suero salino 2:1 (0.1 ml:0.05ml) con una pipeta serológica de graduación 1/100.
Añadir 0.1 ml de la suspensión de hematíes e incubar durante 30 min a 37°C.
Homogenizar y centrifugar la mezcla de células y suero a 1000 rpm / 1 min. Decantar el sobrenadante lo más completamente posible.

Continúa en la siguiente hoja.

específicos, la adición del suero de Coombs provoca una aglutinación visible como se indica en la Fig. 4-9, pero al no haber tales anticuerpos, no ocurre la aglutinación de los hematíes del paciente.

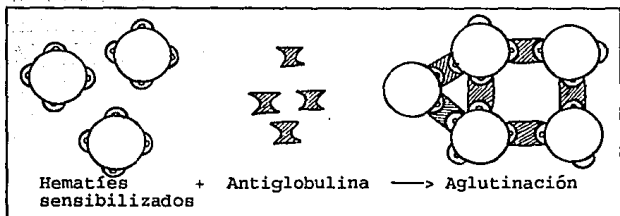


Fig. 4-9. Representación esquemática de la prueba de la antiglobulina directa. Al enfrentar los hematíes sensibilizados a un suero antiglobulina, ésta se fija a los anticuerpos produciéndose puentes de unión que se visualizan como una aglutinación macroscópica [15].

Material:

Tubos de ensaye de 13 x 100 mm.

Tubos de ensaye de 10 x 75 mm.

Gradillas metálicas para tubos de 13 x 100 mm. y 10 x 75 mm.

Pipetas Pasteur.

Pipetas serológicas de 1 ml.

Centrífuga (mod. J-12).

Baño de incubación a 37°C.

Termómetro (escala de 0° a 100°C).

Material Biológico:

Suspensión de hematíes del paciente al 2.0%.

Reactivos (Anexo 1):

Suero de Coombs (antiglobulina humana).

Solución Salina Fisiológica al 0.85% (SSF)

Método [34]:

Colocar 1 ml de sangre anticoagulada en un tubo de ensaye de 13 x 100 mm. y adicionar 5ml de SSF al 0.85%.
Mezclar y centrifugar a 1500 rpm / 1 min. para concentrar los hematíes.
Decantar el sobrenadante lo más completamente posible. Repetir los lavados 3 veces, retirando cada vez todo el sobrenadante. El lavado deberá realizarse inmediatamente y sin interrupción.
Preparar una suspensión de hematíes al 2.0% en medio salino.
En un tubo de ensaye de 10 x 75 mm colocar 0.1 ml de suero antiglobulina humana, añadir 0.1 ml de la suspensión de hematíes al 2.0% y mezclar perfectamente.
DEJAR REPOSAR DURANTE 5 MIN.
CENTRIFUGAR POR UN MIN. A 1500 rpm.
Resuspender el botón de hematíes y comprobar macro y microscópicamente si hay aglutinación. Incluir controles sin los cuales la prueba no tiene validez.

Preparación de los controles:

Control positivo:

Preparar una suspensión de hematíes Rh positivo normales al 2% en SSF al 0.85%.
Colocar en un tubo de ensaye de 10 x 75 mm 0.1 ml de suero anti-D y diluir con suero salino 2:1 (0.1 ml:0.05ml) con una pipeta serológica de graduación 1/100.
Añadir 0.1 ml de la suspensión de hematíes e incubar durante 30 min a 37°C.
Homogenizar y centrifugar la mezcla de células y suero a 1000 rpm / 1 min. Decantar el sobrenadante lo más completamente posible.

Continúa en la siguiente hoja.

Continuación control positivo.

Lavar 3 veces el sedimento celular con 2ml de SSF al 0.85%. Centrifugando a 1000 rpm / 1 min, decantando después de cada lavado.

Después del tercer lavado añadir SSF al 0.85% al concentrado de hematíes hasta el volumen inicial (0.25 ml):

Dilución del anti-D (2:1) = 0.1 ml de suero anti-D +
0.05 ml de SSF + 0.1 ml de
suspensión de hematíes al 2%
= 0.25 ml.

Añadir 0.1 ml de suero anti-humano (de Coombs) a la suspensión de células. Mezclar perfectamente.

Dejar reposar a temperatura ambiente por 5 min.

Si hay aglutinación anotarla. Si no se aprecia aglutinación, centrifugar a 1000 rpm / 1 min y comprobar nuevamente. El resultado final deberá ser la presencia de aglutinación.

Control negativo:

Se prepara de la misma forma que el control positivo, pero se sustituye el suero de Coombs por SSF al 0.85%.

Informe de resultados:

La prueba directa es positiva si hay aglutinación en la prueba y el control positivo y si falta la aglutinación en el control negativo.

Interpretación:

La prueba de antiglobulina es positiva con frecuencia en lactantes con enfermedad hemolítica del recién nacido, en pacientes con anemia hemolítica autoinmune y en receptores de transfusiones de sangre incompatible [34].

Es frecuente encontrar la prueba directa de antiglobulina humana positiva en pacientes con anemia hemolítica inmune inducida por drogas, ej. las penicilinas, cefalotina, metildopa y estreptomycin; en la cual la presencia del fármaco induce la formación de un anticuerpo casi siempre del tipo IgG [34, 69, 99].

Observaciones:

- a) La presencia de unos pocos aglutinados visibles solo por el microscopio, en sí, es un resultado dudoso debiéndose repetir la prueba preferiblemente con un reactivo de antiglobulina distinto [34].
- b) El revestimiento de los hematíes de los grupos A y B con las correspondientes isoaglutininas anti-A y anti-B en recién nacidos, es a menudo difícil de detectar con la prueba de antiglobulina debido a que los isoaglutinógenos A y B solamente pueden ser demostrados en el segundo mes de la vida fetal, pero en general no están completamente desarrollados al nacer. De modo específico los hematíes del grupo A o AB de los recién nacidos reaccionan en la mayoría de los casos como si perteneciesen al subgrupo A₂ o A₂B. Al cumplir un año, los isoaglutinógenos han alcanzado su plena potencia [34]. Para conseguir resultados óptimos hay que centrifugar la muestra enseguida después de la adición del suero de antiglobulinas. Resultan apropiados los reactivos antiglobulinas específicamente estandarizados [34].

4.2.3.2.2. Prueba Indirecta de Coombs

Fundamento [2, 15, 30, 56, 92]:

Se basa en la sensibilización de los hematíes in vitro, exponiéndolos a un suero que contenga anticuerpos IgG incompletos, los cuales no son capaces de aglutinar por sí solos en forma directa, siendo necesaria la adición de un segundo anticuerpo (antiglobulina humana) para inducir la aglutinación (Fig. 4-10).

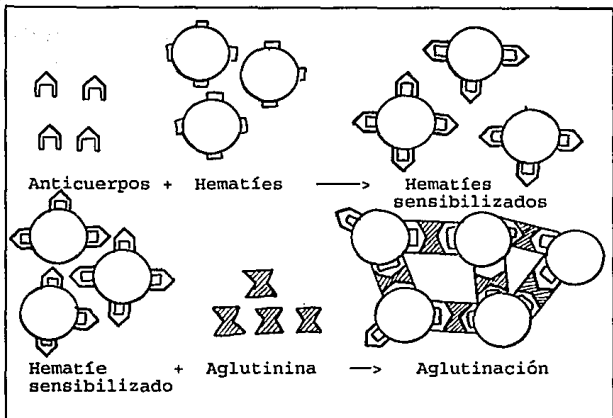


Fig. 4-10. Representación esquemática de la prueba de la antiglobulina indirecta. Los anticuerpos libres en el suero son enfrentados a hematíes con antígenos conocidos produciendo la unión Ag-Ac. Posteriormente los hematíes sensibilizados son enfrentados con un suero antiglobulina que se fija a los anticuerpos produciéndose puentes de unión y se visualizan como una aglutinación macroscópica [15].

Material:

Tubos de ensaye de 13 x 100 mm.

Tubos de ensaye de 10 x 75 mm.

Gradillas metálicas para tubos de ensaye de 13x100 y 10x75 mm.

Pipetas serológicas de 1 ml (1/100).

Pipeta Pasteur.

Centrífuga (Mod. J-12).

Baño de incubación a 37°C.

Termómetro (escala de 0° a 100°C).

Gasas.

Material Biológico:

Suspensión de hematíes al 2% de la muestra a analizar (antígeno) o en su defecto suero de la muestra a analizar (anticuerpo).

Reactivos (Anexo 1):

Suero antiglobulina humana (de Coombs).

Solución salina fisiológica al 0.85% (SSF).

Método [34]:

<p>Nota 1: Si se trabaja con un suero cuyo contenido de anticuerpo se conoce, puede establecerse el contenido de antígeno (fenotipo) en los hematíes.</p> <p>Nota 2: Si se realiza la prueba con hematíes de composición antigénica conocida (fenotipo), puede saberse si un suero problema contiene los anticuerpos correspondientes, ej. anti-Duffy o anti-Kell [53].</p>
<p>Preparar una suspensión al 2% de la muestra a analizar.</p>
<p>En un tubo de ensayo de 10 x 75 mm adecuadamente marcado, colocar con una pipeta de 1 ml (1/100) 0.1 ml de suero que haya de usarse (notas).</p>
<p>Añadir con pipeta de 1/100, 0.1 ml de suspensión de hematíes al 2% y homogenizar.</p>
<p>Incubar la mezcla de hematíes y suero durante 30 min a 37°C, según la reactividad y sensibilidad del suero. Si no ha habido aglutinación después de la incubación, adicionar 2 ml de SSF y centrifugar a 1000 rpm / 1 min.</p>
<p>Decantar el sobrenadante lo más completamente posible y repetir los lavados tres veces con SSF al 0.85% (hasta este paso tenemos a los hematíes sensibilizados con el anticuerpo específico).</p>
<p>En otro tubo de 10 x 75 mm adicionar 0.1 ml de suero antiglobulina humana.</p>
<p>Añadir 0.1 ml de la suspensión de hematíes sensibilizados, mezclar y dejar reposar durante 5 min a temperatura ambiente.</p>
<p>Centrifugar a 1000 rpm / 1 min. Resuspender el botón y comprobar macro y microscópicamente si hay aglutinación.</p>
<p>Para que la prueba sea válida hay que incluir controles en que se empleen hematíes de composición antigénica conocida o anticuerpos de especificidad conocida parcialmente con la prueba.</p> <p>Los controles se realizan de la misma manera que los preparados en la prueba directa de antiglobulinas.</p>

Informe de resultados:

La prueba indirecta de las antiglobulinas es positiva si hay aglutinación en la prueba y en el control positivo y si falta aglutinación en el control negativo.

Interpretación:

La prueba indirecta es uno de los métodos más fidedignos para las pruebas sanguíneas cruzadas y en la detección en los hematíes de factores sanguíneos para los cuales están disponibles los anticuerpos IgG exclusiva o predominantemente, ej. Kell o Duffy. Este método se emplea también para la demostración de variantes de Rho poco reactivos (D^u) [34].

Es una prueba aplicable en la profilaxia de la eritroblastosis fetal, en esta enfermedad se buscan los anticuerpos antes del parto en el suero de la madre [56], asimismo esta prueba permite la demostración de autoanticuerpos en el suero de enfermos con anemia hemolítica autoinmune [34].

Observaciones :

- 1) La prueba indirecta de las antiglobulinas no puede emplearse con hematíes que se sabe dan pruebas de antiglobulina directa positiva [34].
- 2) Existe una modificación de la prueba indirecta de antiglobulina que en algunos casos tiene una sensibilidad aumentada y que se basa en el empleo de hematíes tratados con enzimas. Este método, sin embargo, no puede emplearse para la demostración de anti-Duffy, anti-S y algunos otros anticuerpos que reaccionan con factores sanguíneos que son destruidos o quedan más débiles por la acción de las enzimas proteolíticas [34].

Causas de reacciones falsas negativas:

- a) Neutralización del reactivo de antiglobulinas por la globulina sérica humana, por lavado inadecuado de la suspensión de hematíes.
- b) El empleo aumentado o disminuido de la concentración de hematíes.

c) Períodos inadecuados de incubación en la prueba [34].

4.2.3.3. Determinación del Título de Aglutininas Frías.

Las aglutininas de frío (crioaglutininas) para hematíes humanos pueden tener importancia en el diagnóstico de laboratorio. Estos anticuerpos se descubren en diversos procesos patológicos y pueden también existir en sueros humanos normales [16]. Los anticuerpos de hematíes tienden a pertenecer a una clase dada para un antígeno dado, por lo tanto, anti-A, anti-B, anti-P, anti-M, anti-I y anti-Lewis, son generalmente IgM. El resto es IgG. Los anticuerpos IgM (anticuerpos completos) tienden a reaccionar "en frío" con temperaturas óptimas de 4° a 25°C. Los anticuerpos IgG (anticuerpos incompletos) reaccionan mejor a 37°C [9, 15, 84].

Las aglutininas frías son anticuerpos específicos para un antígeno llamado I, el cual se encuentra presente en los hematíes de casi todos los seres humanos adultos [26, 34, 99, 101]. El síndrome de crioaglutininas debe considerarse en todos los pacientes con anemia hemolítica adquirida que presentan una prueba de antiglobulina directa (PAD) positiva con anti-C₃ y negativa con anti-IgG [76].

Fundamento [34, 99]:

La prueba se basa en una reacción de autoaglutinación de la sangre anticoagulada enfriada a 4°C, a esta temperatura se favorece la formación del complejo antígeno-anticuerpo (Ag-Ac). La aglutinación queda pronto y completamente dispersada al volver a calentar a 37°C.

En el caso de que la aglutinación se deba a las aglutininas de frío (crioaglutininas (CA)), se dispersará al calentarse, mientras que cualquier otro tipo de aglutinación producida por anticuerpo no sufrirá disgregación del aglutinado.

Material:

Tubos de ensaye de 10 x 75 mm.

Gradilla metálica para tubos de ensaye de 10 x 75 mm.

Pipetas serológicas de 1 ml (1/100).

Baño de incubación a 37°C.

Termómetro (escala de 0° a 100°C).

Hielo.

Material Biológico:

Suero del paciente.

Suspensión de hematíes del paciente al 5%.

Reactivos:

Solución salina fisiológica al 0.85% (SSF)

Método [56]:

Extraer sangre y colocarla en incubación a 37°C hasta la retracción del coágulo.

Centrifugar a 2500 rpm / 10 min. Separar suero, evitando la hemólisis. Colocar el tubo con suero en baño de incubación a 37°C.

Extraer sangre de un control normal y mezclar con anticoagulante (sal disódica de EDTA al 5%).

Incubar la muestra sanguínea a 37°C durante 5 min.

Tomar 1 ml de esta muestra y lavar 3 veces los hematíes con SSF al 0.85% previamente calentada a 37°C, centrifugar a 1000 rpm / 1 min en cada lavado.

Preparar una suspensión de hematíes al 5% con SSF previamente calentada a 37°C.

Tanto el suero problema como la suspensión de hematíes al 5% (control normal) deberán mantenerse a temperatura de 37°C hasta el término de la prueba.

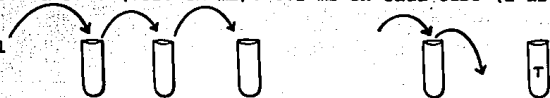
Rotular una serie de tubos de ensaye de 10 x 75 mm y colocarlos en una gradilla metálica a baño de incubación a 37°C, seguir el diagrama siguiente:

Continúa en la siguiente hoja.

Continuación del método

Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Dil.	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2160	1/5120	T
SSF	0.85% a 37°C (Vol. en ml): 0.2 ml en cada tubo (1 al 10)									

Suero del paciente (0.2 ml)



1 Mezclar

2 9 10
realizar diluciones dobles hasta el tubo 9, eliminar el volumen de 0.2 ml después de la mezcla.

Suspensión de hematíes: Adicionar 0.2 ml en cada tubo y al 5% a 37°C. mezclar.

Colocar los tubos en un vaso de precipitado de 250 ml. Este debe colocarse en un recipiente con hielo y refrigerar durante una hora.

Sin centrifugación previa, leer los tubos macroscópicamente investigando la presencia de aglutinación.

Realizar posteriormente una lectura al microscopio, colocando una gota de la mezcla en un portaobjetos previamente enfriado en el refrigerador. Leer con objetivo 40x o 100x.

Anotar el número de tubo en que existe la aglutinación.

Colocar los tubos en baño de incubación a 37°C durante 20 min y volver a leer.

Si el efecto se debe a aglutininas en frío, la aglutinación deberá desaparecer.

Si se observa aglutinación en el tubo 10 es necesario repetir la prueba.

Tubo T = Tubo testigo (tubo 10).

Criterio de lectura:

El título es la recíproca de la dilución del último tubo final de la serie que muestra aglutinación.

Valor de referencia:

Títulos menores de 1:1000 [99].

Interpretación:

Títulos mayores de 1:1000 indican el desarrollo de hemólisis activa [99], y alteraciones caracterizadas por anemia hemolítica y obstrucción de la microcirculación [16, 99], estos anticuerpos aglutinan hematíes en una extremidad enfriada, como la punta del dedo, de la mano o del pie, la nariz o el lóbulo de la oreja, el taponamiento de los capilares por los hematíes agregados causa necrosis local [16].

Un paciente que ha sufrido un choque por frío tiene un grave episodio hemolítico tras de recuperar su temperatura corporal.

Algunas formas de anemia hemolítica autoinmune se asocia con o son causadas por crioaglutininas. El origen de estos anticuerpos puede ser, a que son el resultado de una brecha en la tolerancia a los antígenos normales o que la modificación de los componentes celulares por la terapéutica medicamentosa o la infección viral produce "neoantígenos" que incitan la formación de anticuerpos [16].

Observaciones:

- 1) La temperatura recomendada para la incubación debe observarse estrictamente, efectuar la prueba a 37°C significa mantener esta temperatura desde que se obtienen las muestras sanguíneas hasta que se leen los resultados, puesto que el enfriamiento tendría por consecuencia la adsorción sobre los hematíes de los anticuerpos en frío existentes [34, 56].
- 2) Los títulos de aglutinación fría suelen disminuir cuando la temperatura de incubación aumenta, pero existen variaciones considerables entre los individuos por lo que se refiere al margen térmico dentro del cual se produce aglutinación; algunos sueros reaccionan solamente por debajo de 20°C, otros hasta 35°C [16].

Causas de falsos negativos:

El almacenamiento del suero en forma inadecuada pierde completamente su actividad [34]. El suero puede guardarse algunos días en la nevera a 5°C y hasta 10 a 15 días en la congeladora de una nevera y a -20°C. Puede guardarse prácticamente de una forma

indefinida sin que se pierdan sus propiedades si se somete a liofilización que es la forma más manejable para su conservación [18].

4.2.4. Pruebas para Determinar la Presencia de Hemoglobinuria Paroxística Nocturna.

La hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN) se caracteriza por una anomalía intrínseca adquirida de la membrana del hematíe y aumenta la propensión de los hematíes a su lisis por el C'. El trastorno surge como una mutación somática en una célula primitiva hematopoyética pluripotencial, que puede diferenciarse no solamente para formar hematíes sino también granulocitos y plaquetas, los cuales son asimismo defectuosos en este trastorno. Ocasionalmente la HPN puede desarrollarse tras un episodio evidente de lesión de la médula ósea, ej. después de una aplasia medular idiopática o provocada por fármacos [24, 72, 80, 101].

La hemólisis aumenta a menudo por la noche debido a que la retención de anhídrido carbónico durante el sueño lleva a una ligera caída del pH plasmático, que facilita la activación del C', a consecuencia de ello, se produce una hemoglobinuria nocturna que tiñe la orina del paciente de un color oscuro (de ahí el nombre de la enfermedad) [68, 72, 79].

La causa subyacente del defecto de la membrana del hematíe en la HPN es desconocida, pero guarda relación con uno de los modos de fijación de las proteínas de la membrana. Ciertas proteínas localizadas principalmente en la superficie externa de la doble capa de lípidos, se unen a la membrana por una cola glucolípida, la cual comienza en el COOH-terminal de la proteína y termina en su fijación al fosfatidilinositol, fosfolípido que se encuentra en la capa externa de la doble capa de lípidos. Una de estas proteínas es la enzima acetilcolinesterasa y otra, una proteína denominada Factor Acelerador de Degradación (FAD), cuya actividad se encuentra notablemente disminuída en esta enfermedad [56, 64, 72, 98]. Aunque el déficit de acetilcolinesterasa de los hematíes en la HPN puede constituir un síntoma que aparece en el

curso de la enfermedad, la disminución de la actividad del FAD parece ser, al menos parcialmente, responsable del aumento de la sensibilidad al C', que ocasiona la hemólisis en ese trastorno, asociado a una disminución de pH (6.5 a 7.0) [101].

FAD es una proteína reguladora del C' que inhibe la actividad de las vías clásica y alterna, la cual particularmente inhibe la lisis en suero acidificado por bloqueo de la actividad de amplificación de la C₃ convertasa. Evitando que se lleve a cabo sobre la membrana la secuencia completa de activación del C', con la formación resultante del complejo terminal C_{5b,6,7,8, y 9}, el llamado complejo de ataque a la membrana [59, 64, 72, 98].

Los hematíes de la HPN han sido clasificados en tres categorías basadas sobre su interacción con el C' :

- a) Hematíes de la HPN I.- Reaccionan normalmente con el C' y se piensa que son residuos de células normales, porque son similares a hematíes normales en todo respectivamente.
- b) Hematíes de la HPN II.- Tienen moderada sensibilidad al componente del complemento C₃ y son de 3 a 5 veces más sensibles a la lisis por el C' que los hematíes normales.
- c) Hematíes de la HPN III.- Son células más sensibles al C', siendo de 15 a 25 veces más sensibles al componente del complemento C₃ que los hematíes normales; también tienen una incrementada sensibilidad al componente del C' terminal C₅ a C₉ [69].

4.2.4.1. Prueba de Hemólisis a la Sacarosa.

El diagnóstico de HPN requiere una prueba positiva con suero acidificado (Prueba de Ham), asimismo, las pruebas selectivas son las de hemólisis a la sacarosa y la de lisis de los anticuerpos por frío. Las tres pruebas dependen de una susceptibilidad poco común de las células de HPN a la lisis por el C' [34, 64].

En la prueba de hemólisis con sacarosa los hematíes de la HPN son más sensibles a la hemólisis cuando se colocan en soluciones de baja fuerza iónica, mientras que las células normales no lo son [18, 99].

Fundamento [33, 99]:

Cuando se suspenden hematíes en una solución isotónica de sacarosa no hay lisis osmótica ya que esta solución no penetra la membrana del hematíe. En presencia de pequeñas cantidades de suero, la células HPN sufren la lisis en la citada solución de sacarosa. La baja fuerza iónica de la solución de sacarosa empleada aumenta probablemente los compuestos fijadores del C' de la membrana del hematíe.

Las células sensibles al complemento de la HPN desarrollan unos efectos de la membrana que permiten a la sacarosa introducirse en el hematíe y originan la lisis osmótica. De la misma manera, es posible que defectos de la membrana suficientemente grandes, como para permitir la pérdida del contenido del hematíe sean debidos a la acción del C'.

Material:

Tubos de ensaye de 13 x 100 mm.

Gradillas metálicas para tubos de ensaye de 13 x 100 mm.

Centrífuga (Mod. J-12).

Espectrofotómetro (Baush & Lomb Spectronic 20).

Celdas con l = 1 cm.

Gasas.

Material Biológico:

Suero sanguíneo fresco normal compatible de grupo sanguíneo ABO (SSFN).

Paquete celular del paciente al 50% (PCP).

Paquete celular normal al 50% (PCN).

SSF al 0.85%.

Reactivos (Anexo 1):

Solución isotónica de sacarosa de preparación reciente (SIS).

NH₄OH al 0.04% (v/v).

Método [34]:

	TUBOS	
	1	2
SSFN ABO compatible (ml)	0.25	0.25
SIS (ml)	4.25	4.25
MEZCLAR POR INVERSION		
PCP al 50% (ml)	0.5	--
PCN al 50% (ml)	--	0.5
HOMOGENIZAR PERFECTAMENTE		
Incubar a temperatura ambiente por 30 min.		
CENTRIFUGAR A 2500 rpm POR 10 MIN		
Observar si hay hemólisis en los sobrenadantes. Si existe hemólisis determinar el % de Hb libre en éstos.		
Simultáneamente preparar un blanco y estándar como sigue: BLANCO: 0.25 ml de suero normal compatible ABO más 4.25 ml de SIS. ESTANDAR: 0.5 ml de paquete celular del paciente al 50% más 4.5 ml de NH ₄ OH al 0.04%.		
Leer a 540 nm ajustando a cero de absorbancia con el blanco de reactivo.		

Cálculos:

D.O. estándar ----- 100% de hemólisis.
D.O. tubo problema ----- X % de hemólisis.

Valores de referencia:

Negativo: menor o igual al 5% de hemólisis.

Positivo: mayor al 5% de hemólisis.

Interpretación:

Del 5 al 10% es un resultado dudoso. Si se tiene una lisis mayor al 5% el diagnóstico de HPN es casi cierto. Sin embargo, algunas hemopatías pueden causar este grado de hemólisis. Por encima de un 10% es positivo y virtualmente diagnóstico para HPN [33, 34].

Observaciones:

Causas de falsos positivos:

- a) El empleo de sangre desfibrinada.
- b) El uso de suero del mismo paciente en caso de anemia hemolítica inmune.
- c) El almacenamiento de las soluciones de sacarosa durante largo tiempo [34].

4.2.4.2. Prueba de Hemólisis Ácida de Ham.

Se trata de investigar una posible hemólisis de hematíes defectuosos cuando se ponen en contacto con un suero normal acidificado.

En esta prueba Ham (1952) deduce lo siguiente: Los hematíes de HPN son hemolizados por cualquier suero normal fresco; la hemólisis puede presentarse a un pH normal, pero aumenta al acidificarse el suero; la destrucción del sistema hemolítico sérico por el calor impide el fenómeno de la hemólisis, el lavado de los hematíes del paciente no impide la acción del suero fresco acidificado y finalmente, el suero del paciente no tiene propiedades líticas sobre hematíes normales [18].

Fundamento (Dacie y Lewis 1968) [98, 99]:

En la HPN, los hematíes son sensibles a la lisis por el C', el cual es adsorbido por aquéllos en suero acidificado en ausencia de anticuerpos [34]. En el análisis de la lisis con suero acidificado, el C' es destruido mediante calentamiento, lo cual induce a una pérdida de la actividad hemolítica del suero respecto a las células HPN [98, 99].

Material:

Tubos de ensaye de 10 x 75 mm.

Gradillas metálicas para tubos de ensaye de 10 x 75 mm.

Pipetas serológicas de 1 ml (1/100).

Centrífuga (Mod. J-12).

Baño de incubación a 56°C.

Termómetro (escala de 0° a 100°C).

Espectrofotómetro (Bausch & Lomb Spectronic 20)

Celdas con 1 = 1 cm.

Material Biológico:

Suspensión de hematíes del paciente al 50% (SHP).

Suspensión de hematíes del control normal al 50% (SHCN) (ABO compatible).

Suero sanguíneo fresco del paciente (SsFP).

Suero sanguíneo fresco del control normal (SsFCN).

Suero sanguíneo fresco del control normal inactivado por calor a 56°C por 30 min. (SsFCNI).

Reactivos (Anexo 1):

HCl 0.2 N.

NH₄OH al 0.04%.

SSF al 0.85%.

Método [34]:

Disponer de 7 tubos y rotularlos de acuerdo al esquema siguiente:							
TUBOS	1	2	3	4	5	6	7
SsFCN (ml)	0.5	0.5	--	--	0.5	0.5	--
SsFP (ml)	--	--	0.5	--	--	--	--
SsFCNI (ml)	--	--	--	0.5	--	--	0.5
HCl 0.2N (ml)	--	0.05	0.05	0.05	--	0.05	0.05
MEZCLAR POR INVERSION							
SHP 50% (ml)	0.05	0.05	0.05	0.05	--	--	--
SHCN 50% (ml)	--	--	--	--	0.05	0.05	0.05
MEZCLAR HOMOGENIZANDO PERFECTAMENTE							
Incubar en baño de incubación a 37°C por una hora.							
Centrifugar cada tubo a 2500 rpm / 10 min.							

Continúa en la siguiente hoja.

Continuación del método.

Examinar si hay señales de lisis en el líquido sobrenadante y comparar con la siguiente tabla:

TUBOS	1	2	3	4	5	6	7
Grado de hemólisis cualitativo que se presenta en la prueba positiva.	V	+++	+	-	-	-	-

En caso de que la prueba sea positiva determinar el grado de hemólisis cuantitativo del líquido sobrenadante en los tubos 1, 2 y 3, mezclando 0.3 ml del sobrenadante en 5.0 ml de NH_4OH al 0.04%.

Simultáneamente preparar un blanco y un estándar como sigue:
BLANCO: 0.3 ml del SsCn en 5 ml de NH_4OH al 0.04%.
ESTANDAR 100%: 0.05 ml de hematías del control normal al 50% en 0.55 ml de NaCl al 0.85%, homogenizar. De la mezcla anterior tomar 0.3 ml y adicionar en 5 ml de NH_4OH al 0.04%, mezclar.

Ajustar a cero de absorbancia o 100 de transmitancia el espectrofotómetro con el blanco a una longitud de onda de 540 nm y leer las D.O. (absorbancias) de los tubos 1,2,3 y del estándar, preparados anteriormente.

V = vestigios de hemólisis.

+++ = hemólisis marcada.

+ = ligera hemólisis.

Cálculos:

D.O. estándar ————— 100% de hemólisis.

D.O. tubos 1,2, y 3 ——— X, Y y Z% de hemólisis.

Valor de referencia:

Normal: menor al 10% de hemólisis; en los 3 tubos.

Interpretación:

La lisis de las células HPN aparece con suero normal y del paciente acidificados (este último a menudo en un grado menor). Si la lisis se presenta también con el suero normal acidificado e inactivado por el calor, la prueba es negativa porque las células intensamente esferocíticas pueden reaccionar en esta forma. Las células normales no sufren la lisis en ninguno de los tres tubos. La lisis de las células HPN es siempre parcial, de modo general

entre un 10 y 50% [34, 84, 94]. Una prueba de suero acidificado positiva define la anormalidad HPN, tanto en la HPN típica como en la anemia aplásica (ya que el defecto está asociado con una clona anormal de células hematopoyéticas, resultantes de un evento mutagénico que ocurre durante el curso de aplasia o hipoplasia medular) [18, 69]. Asimismo, se ha observado un proceso raro, la anemia diseritropoyética congénita tipo II (en este desorden la lisis no ocurre con el propio suero del paciente; en este caso es debida a un antígeno extraño del hematíe que reacciona con IgM, un anticuerpo activador del C' presente en muchos sueros normales) [34, 59, 99].

Observaciones:

1) Falsos positivos debidos a:

- a) Suero no compatible. El empleo de suero con isoanticuerpos capaces de reaccionar con las células que se examinan pueden llevar a una positividad siendo las células normales. Este efecto queda anulado empleando suero normal de un donante de grupo sanguíneo AB compatible o tipificando cuidadosamente las células que se van a examinar y las del donante cuyo suero se va a emplear.
- b) Sobreacidificación. Si el pH del suero se encuentra a un nivel demasiado bajo puede aparecer lisis. Cuando hay una sobreacidificación, normalmente hay lisis en el tubo que contiene el suero sanguíneo del control normal inactivado por calor [99].

2) Falsos negativos debidos a:

- a) Suero "impotente". El suero de algunos individuos no lisa rápidamente las células de la HPN. Si se emplea suero de un donante por primera vez, se debe practicar el examen con células de la HPN conocidas para estar seguros de que el suero a emplear es capaz de lisar las células de la HPN [99].

4.2.5. Pruebas para Determinar Esferocitosis Hereditaria.

La esferocitosis hereditaria (EH) o ictericia hemolítica congénita abarca un grupo de trastornos hereditarios de diversa importancia, caracterizados por transmisión genética autosómica dominante y presencia de esferocitos en la sangre periférica [72].

Todos los pacientes con EH padecen un cierto grado de disminución del contenido de espectrina en el esqueleto de la membrana; en la forma recesiva rara de la infección, esta reducción puede llegar a ser del 50% [56]. Puesto que la base molecular del trastorno no puede determinarse en la mayoría de los pacientes, no se sabe si existen algunos o múltiples defectos de la espectrina de los que eventualmente llegue a averiguarse que originan el síndrome de EH. En una minoría de casos ha podido demostrarse un defecto de la espectrina que altera su fijación a la proteína 4.1 [66, 93]. Esta proteína es un componente estructural importante del esqueleto de la membrana que ayuda a determinar la morfología del hematíe y las propiedades mecánicas de la membrana [19, 20, 69].

Cualesquiera que sean las bases moleculares, en la EH existe una anomalía del esqueleto de la membrana del hematíe y, de este modo cambia su forma de disco bicóncavo para convertirse en una esfera (esferocitos). Ello implica una disminución de su deformabilidad y, como consecuencia, los esferocitos quedan retenidos en el bazo, mientras intentan pasar a través de las fenestraciones de los cordones esplénicos para penetrar en los sinusoides de este órgano. Al hallarse inmersos en este ambiente de carencia metabólica (con una baja concentración de glucosa), los hematíes se hacen particularmente propensos a perder más fragmentos de su membrana. Tras un número indeterminado de pases a través del bazo, los hematíes quedan tan alterados que sufren una fagocitosis selectiva por parte de los fagocitos mononucleares del bazo. Por consiguiente la esplenectomía, a pesar de no influir sobre la anomalía subyacente que padece el esqueleto de la membrana de los hematíes corrige la anemia de la EH [31, 66, 72].

4.2.5.1. Prueba de Fragilidad Osmótica.

La forma de disco bicóncavo del hematíe implica un exceso de extensión superficial en relación con su volumen. Esta característica física del hematíe se considera responsable de la deformabilidad normal del hematíe. Si la superficie del hematíe disminuye respecto a su volumen, éste tiende a tomar una forma esférica que da a la célula cierto grado de rigidez que interfiere en el paso de la misma a través de pequeños capilares sanguíneos [84, 99].

La membrana de los hematíes es de tipo permeable. Cuando éstos son colocados en una solución hipertónica pierden líquido (por lo tanto disminuye su volumen y se destruyen) hasta que se establece el equilibrio osmótico con el líquido circulante. Sin embargo, cuando los hematíes son colocados en una solución hipotónica, captan líquido (hinchándose) hasta que se alcanza el equilibrio osmótico o hasta que se rompen. Por lo tanto existe un límite a la hipotonicidad de una solución soportable para los hematíes [99].

La prueba de fragilidad osmótica evalúa la relación entre superficie y volumen de hematíes normales y anormales. Esta prueba depende de la ósmosis; la ruptura de las células resulta de la alteración en su forma y disminución de su resistencia a la fuerza osmótica más que a un cambio en la composición de la célula.

En las condiciones de la prueba las células esferocíticas se rompen más fácilmente que las demás, de tal modo que la prueba de fragilidad osmótica es considerada como el índice más sensible de la magnitud de la esferocitosis [56, 99].

En ciertas Anemias Hemolíticas, ej. EH y Anemias Hemolíticas idiopáticas y sintomáticas adquiridas, la resistencia de los hematíes a la lisis en soluciones hipotónicas disminuye (fragilidad osmótica aumentada), permitiendo que el agua entre a la célula en concentraciones salinas que no deforman los hematíes normales. El agua entra expande la membrana y la hemoglobina escapa. Así es que la fragilidad osmótica indica formación de hematíes esféricos, es decir, disminución de la relación entre

superficie/volumen de éstos [34].

En el caso de las talasemias y enfermedad drepanocítica, la mayor resistencia a soluciones salinas hipotónicas, es decir, menor fragilidad osmótica, es el resultado de un aumento de superficie o disminución de volumen o de contenido bioquímico del hematíe. En estas condiciones este último toma la forma de célula blanco o no se lisa por completo en concentraciones salinas bajas que lisan por completo hematíes normales [69, 84].

Fundamento:

Cuando los hematíes se sitúan en una serie de soluciones de cloruro sódico de concentraciones decrecientes, el agua entra osmóticamente a través de la membrana. Esto resulta en un aumento de volumen de la célula, que inicialmente se convierte en esférica. Una vez que alcanza el volumen crítico de la célula, la membrana empieza a permitir la salida de moléculas de gran tamaño tales como la hemoglobina. La liberación de hemoglobina al líquido sobrenadante se mide espectrofotométricamente y se grafica contra la concentración de cloruro de sódico [84, 99].

Material:

Tubos de ensaye de 13 x 100 mm.

Gradillas metálicas para tubos de ensaye de 13 x 100 mm.

Pipetas serológicas de 1 ml (1/100).

Pipetas serológicas de 5 ml.

Tapones de hule.

Baño de incubación a 37°C.

Termómetro (escala de 0° a 100° C).

Espectrofotómetro (Bausch & Lomb Spectronic 20)

Celdas con l = 1 cm.

Balanza granataria (Serie No. AC5664, capacidad 2 Kg a 0.453 Kg).

Piseta.

Material Biológico:

Sangre desfibrinada.

Reactivos:

Soluciones de cloruro sódico: 1.0, 0.95, 0.90, 0.85, 0.80, 0.75,
0.70, 0.65, 0.60, 0.55, 0.45, 0.40,
0.35, 0.30, 0.25, 0.20, 0.15, 0.10.

Método [34, 99]:

I

Rotular 19 tubos de ensaye de 13 x 100 mm. con la concentración en forma decreciente.

Añadir 5 ml de la concentración de NaCl correspondiente a cada tubo de ensaye.

Añadir 0.05 ml de sangre desfibrinada a cada tubo, procurar que la gota de sangre caiga en el centro de la solución de cloruro sódico.

Mezclar y dejar reposar 30 min.

Centrifugar a 2500 rpm durante 5 min. para facilitar la sedimentación de las células no lisadas.

Tomar las lecturas de D.O. de los sobrenadantes a 540 nm utilizando como blanco 5 ml de solución de cloruro sódico al 0.9% .

Estas lecturas corresponden al tiempo de 0 horas. Graficar el % de hemólisis contra la concentración de cloruro sódico.

II

Con sangre desfibrinada preincubar a 37° C durante 24 horas , realizar el procedimiento anteriormente descrito y obtener el gráfico correspondiente a las 24 horas (% de hemólisis contra concentración de cloruro sódico).

III

Se deben obtener dos gráficos por paciente (0 y 24 horas). La prueba de fragilidad de hematíes es expresada mejor como una curva sobre papel milimétrico lineal incluyendo siempre el control normal e indicando las concentraciones salinas a las cuales:

- a) Se inició la hemólisis.
- b) Esta fue completa.
- c) Ocurrió el 50% de hemólisis.

Cálculo:

$$\% \text{ Hemólisis} = \frac{\text{D.O. tubo "X" de la serie de tubos/paciente} \times 100}{\text{D.O. del tubo 0 por paciente.}}$$

Valores de referencia:

FRAGILIDAD OSMÓTICA DADA EN 50% DE HEMOLISIS:

0 horas	24 horas	[34]
0.4000 a 0.445 % NaCl	0.465 a 0.59 % NaCl	

Interpretación:

Antes de la incubación el límite normal para la fragilidad osmótica es de 0.4 a 0.445 % de NaCl.

La incubación a 37°C durante las 24 horas aumenta la fragilidad de los hematíes normales (Fig. 4-12, [1→1A]). El aumento es incluso más intenso para los hematíes de la esferocitosis hereditaria y de la anemia hemolítica congénita debida al deficit de piruvato cinasa, la hemólisis puede iniciarse entre 0.4% de NaCl y puede ser completa en casi 0.65 y 0.7% de NaCl (Fig. 4-12: [2→2A]). La prueba permite el reconocimiento de la esferocitosis hereditaria de bajo grado en que la fragilidad osmótica no incubada puede ser normal [34].

El aumento de la resistencia lítica del hematíe (fragilidad osmótica disminuída) en la cual la hemólisis comienza a 0.4% de salina y en la que algunas células no hemolizadas pueden estar presentes a 0.30% de salina, es observado en la talasemia, anemia falciforme, y en la anemia hipocrómica ordinaria (ferropénica) y enfermedades hepáticas (ictericia obstructiva, enfermedad de Gilbert) (Fig. 4-11) [34].

Observaciones:

- 1) La prueba debe realizarse tan pronto como sea posible después de tomar la muestra.
- 2) El uso de anticoagulantes del tipo oxalatos que comprende la adición de sales osmóticamente activas es indeseable. La heparina es el anticoagulante de elección, pero puede usarse sangre desfibrinada cuidadosamente.

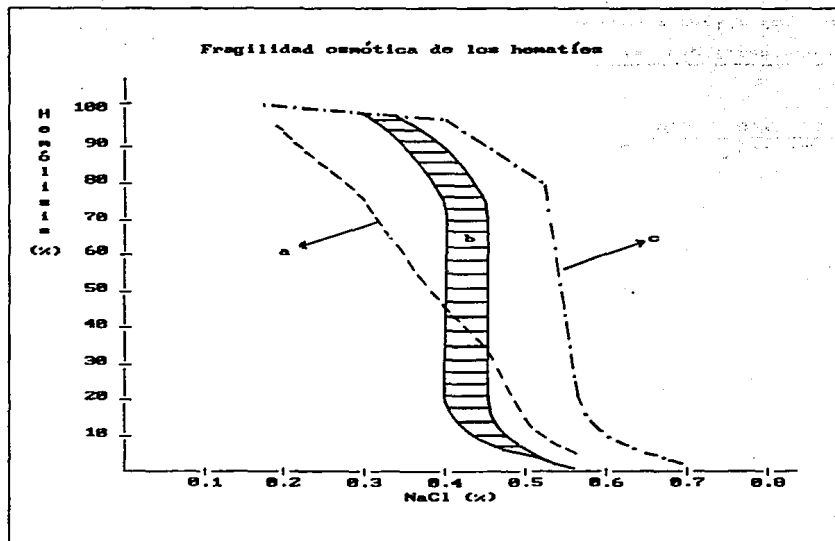


Fig. 4-11. Fragilidad osmótica de los hemátios. a: talasemia
b: zona normal c: esferocitosis hereditaria [32].

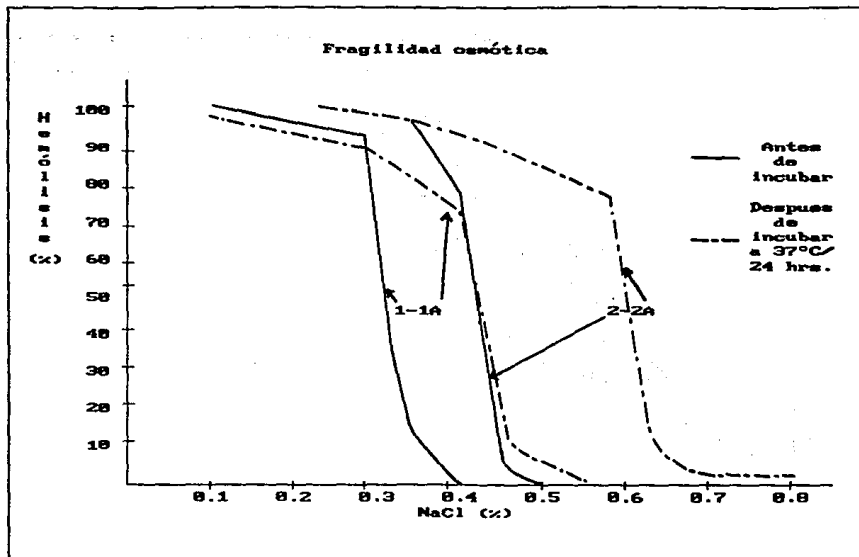


Fig. 4-12 Efecto de la incubación sobre la fragilidad osmótica de los hemátios [34].

1-1A Cambio en la curva de la fragilidad osmótica a partir de "antes de incubar" hasta "después de incubar" en sangre normal.

2-2A Cambio en la curva de fragilidad osmótica a partir de "antes de incubar" hasta "después de incubar" en sangre de un paciente con Esferocitosis Hereditaria.

3) Para la prueba cuantitativa mencionada resulta evidente que las cantidades de sangre añadidas a cada tubo deben ser precisamente iguales.

4) Debe tenerse cuidado de que las gotas de sangre caigan directamente en las soluciones salinas sin hacer contacto con las paredes secas del tubo ya que ésto puede causar pérdida de muestra [34].

4.2.5.2. Prueba de Autohemólisis.

Mientras el hematíe es libremente permeable para los aniones plasmáticos (cloruro y bicarbonato) y para el agua, es de un grado relativamente bajo para los cationes sodio y potasio [72, 93]. A fin de regular su volumen y mantener el balance osmótico en presencia de la presión osmótica de los constituyentes para los que no es permeable (principalmente la hemoglobina y los diversos intermediarios glucolíticos), el hematíe mantiene un sistema energético dependiente de transporte catiónico activo [34, 99].

Los hematíes no contienen glucógeno y dependen de la glucosa para la producción de ATP. Mediante la incubación sin glucosa los hematíes normales sufren variaciones estructurales y químicas progresivas. Los niveles de 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG) y de ATP descienden y en ausencia de ATP se pierde el control del volumen.

Durante las primeras 24 horas, las células aumentan de volumen debido a una entrada de sodio que supera la salida de potasio. Estos hematíes se asocian con un aumento de la fragilidad osmótica [99]. Los eritrocitos que han sufrido estas variaciones tienen una viabilidad disminuída cuando se reinyectan en la circulación. Después de 24 a 48 horas de incubación se pierde la impermeabilidad de la membrana para los cationes, y los cationes intracelulares se equilibran con el medio. La pérdida de potasio (K^+) se manifiesta y se acompaña de la pérdida de fosfato y de un número de intermediarios glucolíticos que origina

reducción del volumen celular. Simultáneamente, se pierden los lípidos de la membrana y decrece el volumen hemolítico crítico de la célula, Aproximadamente después de las 48 horas de incubación, los hematíes normales se vuelven permeables para la hemoglobina y ocurre autohemólisis [99].

Fundamento (Dacie y Lewis, 1968) [34, 99]:

Cuando la sangre desfibrinada estéril se incuba a 37°C, los hematíes sufren una serie compleja de cambios existiendo un proceso hemolítico gradual. Las células con defectos metabólicos o de membrana manifiestan una lisis mayor que las normales. A pesar de que el mecanismo exacto de la lisis es probablemente muy complejo, parece que la imposibilidad de mantener los gradientes catiónicos juega un papel importante en la esferocitosis hereditaria.

Material:

Matraz Erlenmeyer de 250 ml estéril (con 15 esferas de vidrio de 2 a 4 mm de diámetro).

Tubos de ensaye de 13 x 100 mm con tapón de rosca estériles.

Tubos de ensaye de 15 x 100 mm.

Gradillas metálicas para tubos de ensaye de 13x100 mm y 15x100mm.

Pipetas serológicas de 1 ml (1/100) estériles.

Pipetas serológicas de 10.0 ml.

Pipetas Sahli con tubo látex.

Ectrofotómetro (Bausch & Lomb Spectronic 20).

Celdas con l=1 cm.

Microcentrifuga IEC MB Centrifuge (Damon/IEC-División).

Centrifuga (Mod. J-12).

Lector para hematocrito (IEC).

Balanza granataria (Serie No. Ac5664., cap. 2Kg - 0.453 Kg).

Termómetro (escala 0° a 100°C).

Material Biológico:

Sangre periférica desfibrinada estéril.

Reactivos (Anexo 1):

Solución estéril de glucosa al 10% en cloruro sódico al 0.85%.

SSF al 0.85% estéril.

Solución de Drabkin.

Método [99]:

Se toman con una jeringa estéril, 10 ml de sangre y se desfibrinan mediante agitación ligera y constante en un matraz Erlenmeyer estéril el cual contiene esferas de vidrio.

Adicionar 0.1 ml de solución de glucosa al 10% estéril en SSF al 0.85% en 2 tubos de ensaye de 13 x 100 mm con tapón de rosca; a otros 2 tubos adicionar 0.1 ml de SSF al 0.85% estéril.

Colocar 2 ml de sangre desfibrinada a cada tubo (2 con glucosa al 10% en SSF al 0.85% y 2 con SSF al 0.85%).

Incubar a 37°C durante 48 horas. Invertir una vez los tubos a las primeras 24 horas y continuar la incubación por 24 horas más.

Cumplidas las 48 horas de incubación:

Homogenizar 2 de los tubos (glucosa al 10% en SSF al 0.85% y SSF al 0.85%). De éstos pipetear 0.02 ml y colocarlos en 10 ml de solución de Drabkin para determinar la concentración de Hb, asimismo determinar el Hto.

Los 2 tubos restantes (glucosa al 10% en SSF al 0.85% y SSF al 0.85%) se centrifugan a 2500 rpm por 15 min para obtener suero. Adicionar 0.2 ml del suero de cada uno de los tubos anteriores a 2 tubos de ensaye de 15 x 100 mm que contengan 10 ml de solución de Drabkin respectivamente.

Efectuar las lecturas de las D.O. a 540 nm. Utilizar como blanco: 10 ml de solución de Drabkin tanto para las muestras de sangre como para las de suero.

Cáculos:

$$\text{Fórmula general del \% de Hemólisis} = \frac{\text{ASr (100 - Htor)}}{\text{ABr} \times 10}$$

Donde:

ASr = D.O. de la muestra de suero en el tiempo T (48 horas).

Htor = Hematocrito en el tiempo T (48 horas).

ABr = D.O. de la muestra de sangre en el tiempo T (48 horas).

$$\% \text{ de Hemólisis en SSF} = \frac{\text{ASr(ssf) (100 - Htor(ssf))}}{\text{ABr(ssf)} \times 10}$$

$$\% \text{ de Hemólisis con Glucosa} = \frac{\text{ASr(G) (100 - Htor(G))}}{\text{ABr(G)} \times 10}$$

Valores de referencia:

Con glucosa = inferior al 0.6%

Con SSF = inferior al 3.5% [99]

Interpretación:

La autohemólisis, en ausencia de glucosa, está generalmente aumentada en esferocitosis hereditaria (10 al 50%), este porcentaje de hemólisis puede disminuir mediante la adición de glucosa en forma variable; mientras que en el sujeto normal (en ausencia de glucosa) raramente excede del 4% [99].

Los pacientes con anemia hemolítica congénita no esferocítica cuyos hematíes muestran únicamente una moderada autohemólisis (entre 3 y 6% en SSF) y ésta es corregida por la glucosa, se clasifican como portadores de anemia hemolítica congénita no esferocítica tipo I [34, 99].

Los pacientes en quienes la autohemólisis es considerable sin glucosa (entre 7 y 15%) y en los que este defecto no se corrige mediante la adición de glucosa, se clasifican como portadores de una anemia hemolítica no esferocítica de tipo II [34, 99].

La autohemólisis está también aumentada en las anemias

autoinmunes con esferocitosis y en las anemias hemolíticas hereditarias enzimopáticas (deficiencia de piruvato cinasa, etc.). En las primeras, la adición de glucosa usualmente no protege y en las segundas la respuesta a la glucosa es variada [99].

4.2.6. Pruebas para Determinar Deficiencias Enzimáticas del Hematíe.

Para conocer las anomalías enzimáticas de los hematíes es preciso conocer su metabolismo glucolítico, así como algunos procesos de oxido-reducción que tienen lugar en los hematíes [18, 93].

Desde el punto de vista metabólico, el hematíe es un corpúsculo empobrecido, por carecer de núcleo, mitocondrias, retículo endoplásmico rugoso y de otros organelos; tampoco puede tener ácidos nucleicos ni ciertas cadenas energéticas, como el ciclo de Krebs y la cadena de citocromos. Le es imposible la síntesis de moléculas completas y no puede realizar el metabolismo de las grasas ni el de los prótidos. Contiene una solución de hemoglobina al 33% y una baja concentración de enzimas y otros componentes que intervienen en un número limitado de reacciones metabólicas. Estas reacciones dan lugar a 4 sustancias importantes para la función de la célula:

- 1) Adenosín-Trifosfato (ATP), que proporciona la energía necesaria a las bombas catiónicas para mantener la concentración intracelular normal de cationes, así como para otras reacciones que permiten a la membrana conservar su forma y grado de deformabilidad.
- 2) Dinucleótido de Nicotinamido-Adenina reducido (NADH), necesario para reducir la metaemoglobina.
- 3) Glutatión reducido (GSH), que sirve de reservorio de la potencia reductora para proteger la Hb de la lesión oxidativa a que darían lugar el peróxido de hidrógeno y otros peróxidos.

4) 2,3-Difosfoglicerato (2,3-DPG), que facilita la liberación del oxígeno de la hemoglobina en las condiciones de tensión de oxígeno existentes en los tejidos y que puede intervenir también en reacciones con la proteínas del esqueleto de la membrana, necesarias para conservar la deformabilidad normal de la membrana del hematíe [18, 72, 93].

Pero su función se cumple con una energía proporcionada por la degradación de la glucosa en todo el transcurso de su vida. Con ello tiene suficiente para sus necesidades y es capaz de sobrevivir una vida de 120 días a lo largo de la cual está sujeto a numerosas agresiones mecánicas y químicas [18].

La integridad funcional y física de la Hb, y por ende el hematíe maduro, depende de la energía derivada de la conversión de glucosa en lactosa, ya sea por la vía Shunt oxidativa (aerobia) de hexosa monofosfato (HMP), o la vía anaerobia de Embden-Meyerhof. Muchas enzimas son necesarias para mantener las vías de las que depende la degradación. Las deficiencias severas congénitas (o raramente adquiridas) de estas enzimas traen cambios funcionales de la Hb y hemólisis, produciendo el cuadro de anemia hemolítica no esferocítica hereditaria [84].

Las enzimopatías del hematíe, son anomalías congénitas a menudo asintomáticas, y que a veces se manifiestan al establecerse contacto con ciertas sustancias a dosis usualmente inofensivas, pero que en los sujetos marcados con estas deficiencias pueden provocar cuadros hemolíticos a veces graves [18, 84, 94].

En el hematíe normal existen dos componentes metabólicos importantes: la glucólisis y los procesos de óxido-reducción. Todas las deficiencias enzimáticas se refieren a estos 2 procesos.

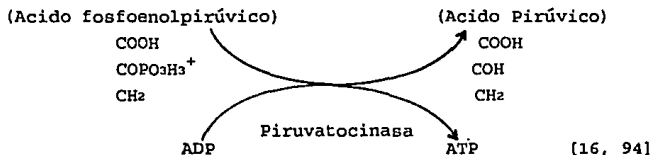
Por lo que respecta a la glucólisis, las deficiencias pueden afectar a ciertas enzimas determinadas, que pueden afectar enzimas de las dos vías, tanto de la aerobia (Pentosas) como de la anaerobia (Ciclo de Embden-Meyerhof). El otro componente metabólico es el de las óxido-reducciones, pudiendo existir deficiencias o anomalías en las metahemoglobinreductasas, en enzimas relacionadas con el glutatión o en esta misma sustancia y

en la catalasa; este grupo no es anemizante [18, 84].

Existen dos deficiencias enzimáticas que afectan directamente a enzimas de la glucólisis y que son verdaderamente importantes desde el punto de vista clínico: la de la Glucosa-6-Fosfato-Deshidrogenasa (G-6-PD), que afecta a millones de individuos y que corresponde al atajo de las pentosas y la deficiencia de la Piruvato Cinasa (PC), del ciclo de Embden-Meyerhof (Tabla 4-7 y Fig. 2-3) [18, 28, 69].

4.2.6.1. Deficiencia de Piruvato Cinasa.

La piruvato cinasa (PC) estabiliza uno de los pasos productores de energía de la glucólisis, la transferencia de fosfato desde el fosfoenol piruvato hasta ADP, lo que da lugar a la fosforilación de un compuesto de gran energía, el ATP, de la forma siguiente:



La reacción en esencia es irreversible. Las propiedades cinéticas de la PC están influidas intensamente por cantidades insignificantes de difosfato de fructosa [13, 28]. Un déficit en la enzima PC es una causa importante de enfermedad hemolítica congénita no esferocítica [99]. Se hereda como una característica autosómica recesiva, ambos sexos se ven afectados por igual. El diagnóstico se establece mediante una prueba de investigación específica o por pruebas enzimáticas [34, 69, 99].

Tabla 4-7. Clasificación de las deficiencias enzimáticas [18].

1) Deficiencias de las enzimas de la glucólisis.

A) Deficiencias del ciclo de Embden-Meyerhof.

- a) Hexocinasas.
- b) Fosfofructosacinasas.
- c) Triosafosfatodeshidrogenasa.
- d) Fosfogliceromutasa.
- e) Fosfohexosaisomerasa.
- f) Fosfotriosaisomerasa.
- g) Fosfoglicocinasas.
- h) Piruvatocinasas.

B) Deficiencias del atajo de las Pentosas.

- a) Hexocinasas.
- b) Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.
- c) 6-fosfogluconodeshidrogenasa.
- d) Lactonasa.
- e) Epimerasa.
- f) Transquelotasa.

2) Deficiencias de mecanismos energéticos.

A) De óxido-reducción.

- a) Glutación reducido.
- b) Glutación reductasa.
- c) Glutación peroxidasa.
- d) Catalasa.

B) De fosforilizaciones.

- a) Adenosín trifosfato.
- b) Adenosín trifosfatasa.
- c) Adenilatocinasas.

3) Miscelánea.

- A) Hemoglobinas inestables.
- B) Aumento de la lecitina del estroma.
- C) Hematíes con sodio bajo y potasio alto,

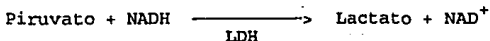
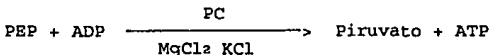
Mecanismo de Hemólisis:

La PC cataliza la formación de piruvato desde fosfoenolpiruvato (PEP) con la generación de ATP desde ADP [28]. Los hematíes generan aproximadamente 90% de sus requerimientos energéticos a través de la vía de la glucólisis anaeróbica de Embden-Meyerhof. Los hematíes deficientes en PC fallan para generar cantidades suficientes de ATP para mantener la función normal de la membrana del hematíe [69]. En los defectos graves de PC, la anemia hemolítica se debe probablemente a una glucólisis imperfecta en el hematíe, la cual depende a su vez del metabolismo de la glucosa a lactato para proveer los requerimientos de energía del hematíe. Debido a la incapacidad heredada de catalizar normalmente un determinado paso en la glucólisis, los reticulocitos y otros hematíes jóvenes probablemente sobreviven un corto espacio de tiempo en virtud de su más flexible y, cuantitativamente, más activa maquinaria metabólica. A medida que envejece la célula, sus actividades enzimáticas incapaces de mantenerse se desgastan y decaen. Este proceso normal aumentado por una imperfección genética determinada de un punto de la glucólisis conduce a un acortamiento de la vida media y a la anemia hemolítica [28, 44, 93, 99].

Prueba Cuantitativa del Déficit de Piruvato Cinasa.

Fundamento (Beutler, 1971) [94]:

La PC, cataliza la fosforilación del ADP al ATP por la acción del PEP con formación de piruvato. La pérdida de fluorescencia del NADH bajo luz ultravioleta se observa como prueba de la presencia de PC, teniéndose la siguiente reacción:



Material:

Micropipetas de 5, 10, 20, 50, 100 y 500 μl .

Baño de incubación a 37°C (Serial No. A16145).

Termómetro (escala 0° a 100°C).

Espectrofotómetro para celdas de cuarzo.

Material Biológico:

Hemolizado 1/20 (dializado 12 horas en solución estabilizadora) (Anexo 1).

Reactivos (Anexo 1):

Tampon Tris HCl-EDTA, pH 8.0.

KCl (mol/l).

MgCl₂ (0.1 mol/l).

NADH (2 mmol/l).

ADP (30 mmol/l).

LDH (60 U/ml).

PDF (10 mol/l).

PEP (100 mmol/l).

Agua bidestilada.

Método [94]:

Efectuar las siguientes indicaciones:

	CELDAS			
	1	2	3	4
	(B)	(S ₁)	(S ₂)	(S ₂ + PDF)
Tampón Tris HCl-EDTA pH 8.0 (μl)	100	100	100	100
KCl mol/l (μl)	100	100	100	100
MgCl ₂ 0.1 mol/l (μl)	100	100	100	100
NADH 2 mmol/l (μl)	100	100	100	100
ADP 30 mmol/l (μl) (neutralizado)	---	50	20	20
LDH 60 U/ml (μl)	100	100	100	100
PDF 10 mol/l (μl)	---	---	---	50
H ₂ O bidestilada (μl)	380	330	455	405
Hemolizado 1/20 (μl)	20	20	20	20
INCUBAR A 37°C (DURANTE 10 MINUTOS)				
PEP 100 mmol/l	100	100	5	5
MEDIR LA VARIACION DE LA ABSORBANCIA (A) POR MINUTO A 340 nm A UNA T° OSCILANTE ENTRE 25 A 37°C.				

Cálculos:

$$UI/g = \frac{A^{340}}{6.22} \times \frac{1}{20} \times \frac{100}{Hb} = \frac{A^{340}/min.}{Hb(g/dl)}$$

Donde:

B = Blanco.

S₁ = Sustrato (PEP) a saturación.

S₂ = Contiene una baja concentración de PEP.

S₂ + PDF = Contiene el activador PDF.

Con lo anterior se pretende por una parte, medir la actividad de PC a concentración saturada de su sustrato PEP (reacción enzimática convencional), y por otra, detectar la posible existencia de variantes deficientes de PC con alteración de su comportamiento cinético, por el cual el déficit solamente puede manifestarse a concentraciones no saturadas de PEP o

también bajo activación por los productos de degradación de la fibrina (PDF) [84, 94].

Valores de referencia:

(X \pm 2 DE a 37°C).

PC (S₁): 6.9 a 11.1 UI/g Hb.

PC (S₂): 9.0 a 31.0 UI/g Hb.

PC (S₂ + PDF): 42.5 a 60.9 UI/g Hb.

Interpretación:

La PC es una enzima dependiente de los hematíes jóvenes, por lo que aumenta, a veces intensamente, en el curso de una reticulocitosis.

En ciertas anemias, especialmente las debidas a dishemopoyesis, puede hallarse disminuída incluso hasta en un 50% de su actividad normal [94].

Observaciones:

Dado que la actividad de la enzima (PC) aumenta en aproximadamente un 2 a 7% por grado, no es posible obtener una buena reproducibilidad sin un equipo que este termostáticamente controlado [99].

4.2.6.2. Deficiencia de la Glucosa-6-Fosfato Deshidrogenasa.

La glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-FD) constituye la enzima del hematíe que se ha investigado de un modo más exhaustivo.

Cataliza la oxidación de la glucosa-6-fosfato (G-6-P) a 6-fosfogluconolactona, que rápidamente se desdobla a ácido 6-fosfogluconico. En la reacción el NADP⁺ se reduce a NADPH [18, 28, 93, 99].

La enzima es mucho más activa en los hematíes jóvenes que en los viejos. En presencia de su coenzima, el NADP⁺, la enzima se desplaza electroforéticamente como una banda principal única [18,

99]. Se conocen muchas mutaciones que afectan la actividad, estabilidad y propiedades cinéticas de la enzima [99]. Se tienen dos variantes de la G-6-PD presentes en personas normales denominados tipo A y tipo B, cuya mayor diferenciación se establece por electroforesis en medio alcalino.

El tipo B es característico de la raza blanca, y el tipo A de las razas de color [18, 72].

La deficiencia de G-6-PD es una enfermedad hereditaria en la que está muy disminuída la actividad de la enzima. Particularmente los hematíes se encuentran gravemente afectados y la deficiencia de G-6-PD da como resultado una anemia hemolítica, sobre todo después de la administración de fármacos o agentes químicos [99] que incluyen sulfonamidas, ácido p-amino-salicílico fenilhidrazina, acetanilida, primaquina y nitrofurantoina o bajo otras condiciones de estrés [67, 70].

El defecto de la G-6-PD se debe a la herencia de alguna de la amplia gama de anormalidades de la estructura del gen X que condiciona la secuencia de aminoácidos de la enzima G-6-PD. La enzima normal que se forma puede ser sintetizada en cantidad normal, pero su estabilidad in vivo puede estar disminuída como ocurre en el caso de la mutación A. Otras mutaciones tal como la que produce la enzima, parecen originar la formación de un menor número de moléculas de enzima cada una de ellas con actividad enzimática normal, pero con propiedades distintas [28, 69, 72, 93, 99].

Mecanismo de Hemólisis:

Se desconoce la razón exacta del por qué la vida media de los hematíes deficientes en G-6-PD se acorta en muchas circunstancias como en la administración de fármacos, el período neonatal o durante las infecciones.

La hemólisis inducida por fármacos en las células deficientes en G-6-PD se acompaña generalmente de la formación de los cuerpos de Heinz, partículas de Hb desnaturalizada y proteínas del estroma, que solo se producen en presencia de oxígeno.

El mecanismo por el cual tales cuerpos de Heinz se forman y se agregan al estroma de los hematíes ha estado sometido a múltiples investigaciones y especulaciones. Se ha encontrado que la exposición de los hematíes a ciertos fármacos da lugar a la formación de bajos niveles de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), como si el fármaco reaccionase con la Hb. Por otra parte, algunos productos pueden formar radicales libres que oxidan el glutatión reducido (GSH) sin formación de H_2O_2 como intermediario [10]. La formación de radicales libres de GSH por medio de la acción del peróxido o por acción directa de los medicamentos puede seguirse de oxidación del GSH a la forma de disulfuro (GSSG) [67, 70, 99], o bien, combinando el glutatión con la Hb para formar un disulfuro mixto. Estos disulfuros mixtos se cree que se forman inicialmente con el grupo sulfhidrilo en posición 93 de la Hb. El disulfuro mezcla de GSH y Hb probablemente es inestable y sufre cambios en su estructura, exponiendo los grupos sulfhidrilos internos a la oxidación y a la formación de disulfuros mezclados. Una vez que a ocurrido esta oxidación la Hb está irreversiblemente desnaturalizada y precipitada en forma de cuerpos de Heinz. Hasta cierto punto, los hematíes normales pueden defenderse de estos cambios por reducción de GSSG a GSH y por reducción de los disulfuros GSH-Hb por medio de la reacción de la glutatión reductasa [11, 28]. Sin embargo, la reducción de estos puentes disulfuro requiere una fuente de NADPH. Los hematíes deficientes en G-6-PD son incapaces de reducir el NADP a NADPH en proporción normal. En consecuencia, no pueden liberar H_2O_2 ni reducir los disulfuros de Hb-GSH. Cuando tales células son estimuladas por fármacos forman cuerpos de Heinz más rápidamente que las células normales. Las células que contienen cuerpos de Heinz encuentran dificultades para salvar la barrera esplénica y son eliminadas rápidamente de la circulación [11].

La formación de MetaHb acompaña frecuentemente a la administración de fármacos que tienen capacidad de producir hemólisis de las células con defecto de G-6-PD. Los grupos heme de la MetaHb se separan de la oxihemoglobina (OxiHb). Por esto, se ha sugerido que la formación de MetaHb puede ser un paso importante en la degradación oxidativa de la Hb a cuerpos de

Heinz (o es un efecto secundario incidental de fármacos oxidativos). La susceptibilidad a la ictericia neonatal de los niños deficientes en G-6-PD puede representar el resultado de la escasez de G-6-PD junto con un descenso de los niveles séricos de glucosa, ambas circunstancias se encuentran en el período neonatal, y la relativa inmadurez enzimática del hematíe del recién nacido [11, 12, 69, 67, 99].

4.2.6.2.1. Prueba de los cuerpos de Heinz para Células Deficientes de Glucosa-6-Fosfato Deshidrogenasa.

Fundamento [34, 69, 84]:

La acetilfenilhidrazina, sustancia oxidante, se añade a la sangre del paciente y a la del control. Después de una incubación a las 2 horas y 4 horas a 37°C se examina la posible existencia de los cuerpos de Heinz en cada una de las muestras mediante la coloración con cristal violeta.

Material:

Tubos de ensaye de 13 x 100 mm.,

Tapones de hule.

Gradillas metálicas para tubos de ensaye de 13 x 100 mm.

Pipetas serológicas de 1 ml (1/100).

Pipetas serológicas de 5 ml.

Baño de incubación a 37°C (Serial No. A16145).

Gasa.

Cubreobjetos.

Portaobjetos.

Pipetas Pasteur.

Microscopio óptico (Binocular Rossbach).

Termómetro (escala 0° a 100°C).

Material Biológico

Sangre completa.

Reactivos (Anexo 1):

Acetilfenilhidrazina (r.a.).

Violeta de cristal.

Oxalato de sodio y potasio.

Método [34]:

A 2 ml de solución de acetilfenilhidrazina contenida en un tubo de ensaye de 13 x 100 mm, adicionar 0.1 ml de sangre problema (homogenizada). Se corre otro tubo de la misma forma pero con sangre del control normal.

Mezclar y colocar en baño de incubación a 37°C durante 2 horas.

Al término de la incubación, colocar una pequeña gota de cada muestra en un portaobjetos y adicionar una gota de violeta de cristal, homogenizar.

Tapar las preparaciones con un cubreobjetos y dejar reposar 10 min.

Examinar al microscopio con el objetivo de 40x la posible existencia de cuerpos de Heinz tanto para el control como para la muestra problema.

Contar los cuerpos de Heinz presentes en un total de 100 células y sacar el porcentaje correspondiente.

Valores de referencia:

De 0 a 30% [34]

Interpretación:

Los valores de individuos con déficit de G-6-PD (o defectos en el sistema glutatión o hemoglobinas inestables) serán más elevados generalmente más de un 45% [34].

4.2.7. Pruebas para Determinar Hemoglobinopatías.

En los individuos normales se encuentran por lo menos tres tipos distintos de hemoglobinas (Tabla 4-8 y Fig. 4-14).

1) Hemoglobina adulta (Hb A₁): $\alpha_2\beta_2$. Consiste de dos porciones moleculares idénticas, cada una de ellas formada por dos cadenas polipeptídicas α (constituida por 141 a.a.) y dos cadenas β (constituida 146 a.a.). Cada cadena está ligada a un grupo heme. La molécula es elipsoidal, con los 4 grupos heme en su superficie donde funciona combinándose reversiblemente con el oxígeno (O₂) o bióxido de carbono (CO₂). La Hb A₁ es la fracción mayor en adultos y constituye el total de hemoglobina de 92 a 96% [34, 62, 69, 72].

2) Hemoglobina A₂: $\alpha_2\delta_2$. Constituye del 1.5 al 3.5% de la hemoglobina del adulto normal y consiste de dos cadenas α como la Hb A₁ más dos cadenas δ . Las cadenas α son similares a las cadenas δ difiriendo solamente en 8 de sus 146 a.a. [34, 62, 69, 72].

3) Hemoglobina Fetal (HbF): $\alpha_2\gamma_2$. La HbF se asemeja a la HbA en que posee 2 cadenas α , pero difiere de ella en que tiene 2 cadenas γ en vez de 2 cadenas β . La producción de cadenas γ comienza durante las primeras fases de la vida fetal y continúa luego sin interrupción. La producción de cadenas γ empieza a disminuir poco después del nacimiento, hasta ser reemplazada por cantidades crecientes de cadenas β . Al nacer la HbF constituye cerca del 75%, pero a los 6 meses de edad desciende por debajo del 5%. El adulto normal sintetiza tan sólo cantidades mínimas de HbF (menor del 1%) [34, 62, 69, 72].

Cuando se presentan alteraciones cualitativas o cuantitativas de la globina, secundarias a mutaciones genéticas, cuya consecuencia puede ser una modificación estructural (hemoglobinopatías estructurales) o a una disminución más o menos importante en la síntesis de una cadena globínica estructuralmente normal (talasemias) se denominan hemoglobinopatías (globinopatías) [34, 69, 72, 94].

Tabla 4-8. HEMOGLOBINAS NORMALES PRESENTES EN EL ADULTO..

Denominación	Cadenas de globina	Hb total (%)	Intervalo de edad
HbA ₁	$\alpha_2\beta_2$	92 al 96	Existe después del nacimiento y a partir del 6° mes de vida constituye el $\frac{2}{3}$ de Hb total en el adulto [34, 69, 72].
HbA ₂	$\alpha_2\delta_2$	1.5 al 3.5	Constante desde el nacimiento [36, 69, 72, 94].
HbF	$\alpha_2\gamma_2$	1	Elevada durante la vida fetal, después del nacimiento disminuye hasta permanecer constante a los 6 meses de edad [18, 34, 69].

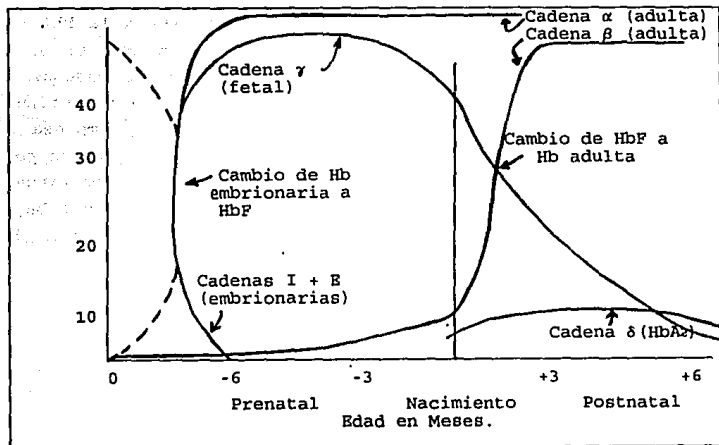
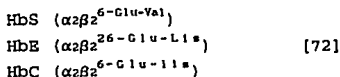


Fig. 4-14. Síntesis de cadenas de globina prenatal y postnatal.

Las anomalías genéticas pueden dar lugar a una variante estructural de la hemoglobina, alterar la producción de una cadena de polipéptidos o ambas cosas a la vez. La gran mayoría de las anomalías estructurales resultan de sustituciones de un sólo aminoácido como consecuencia del reemplazamiento de un sólo nucleótido en un codón (tripleto de nucleótidos que codifican un aminoácido). Las variantes estructurales raras, surgen a consecuencia de la delección de un nucleótido de un codón, lo que da lugar a un cambio en la trama de lectura de los codones en sentido descendente, con la consiguiente delección de uno o más residuos de aminoácidos o, a la inversa con extensión de la cadena polipeptídica por alterarse el codón final [72].

Según sean su clase y localización, la sustitución de un aminoácido en una cadena de globina puede alterar o no el comportamiento de la molécula de hemoglobina. Si la anomalía estructural produce manifestaciones clínicas, se dice que el paciente padece una hemoglobinopatía. Teniendo en cuenta su prevalencia a escala mundial, las variantes estructurales de importancia de la cadena son 3:



Mecanismos responsables de la enfermedad clínica.

Cuando una anomalía genética de la síntesis de globina da lugar a una enfermedad clínica interviene en ella uno de los siguientes mecanismos:

- 1) Polimerización y Gelación intracelulares de las moléculas de Hb.

En los hematíes que contienen grandes cantidades de Hb S, este fenómeno se incrementa cuanto mayor es la desoxigenación de la molécula de Hb, inicia la formación de células rígidas y deformes. Tales células, denominadas falciformes o drepanocitos, tienen una supervivencia sumamente acortada y son capaces de viajar normalmente a través de la microcirculación. A

consecuencia de ello, se produce una anemia hemolítica crónica y crisis dolorosas de oclusión vascular. Aunque en menor grado, la Hb C tiende a agregarse y a dar lugar a células más rígidas de lo normal [72].

2) Supresión de la síntesis de la cadena de globina.

Ello da lugar a los síndromes talasémicos. La anemia surge no solamente a consecuencia de una reducción global de la síntesis de Hb A, sino que tiene igual importancia a este respecto el desequilibrio en la síntesis de la cadena de globina. En las talasemias β , se acumula un exceso de cadena α en el hematíe en desarrollo; a consecuencia de ello se forman precipitados de cadenas α agregadas que se asemejan a los cuerpos de Heinz y se adhieren a la membrana celular. Los precursores del hematíe en desarrollo que contienen estos precipitados pueden destruirse en el seno de la médula ósea, por lo que se produce una eritropoyesis notablemente inefectiva, característica de las Talasemias β graves.

Los hematíes que consiguen penetrar en la circulación son rápidamente eliminados de ella por los fagocitos mononucleares del bazo. Sometidos a este estrés, en la médula algunos precursores del hematíe siguen una vía de diferenciación más primitiva, con la formación resultante de hematíes que contienen cantidades variables de Hb F. Debido a ello reduce el número de cadenas γ libres, tales hematíes son capaces de supervivencias más prolongadas [1, 72, 84].

En la talasemia α , las cadenas β en exceso existentes en la célula forman tetrámeros (β_4) que pueden permanecer en solución durante cierto tiempo, como una Hb anormal, en las células circulantes, denominadas Hb H. Los pacientes con limitada capacidad de síntesis de las cadenas α forman también una Hb F que es anormal y que contienen tetrámeros de las cadenas γ (Hb Bart's) [1, 72, 84].

3) Desnaturalización de las hemoglobinas inestables.

Existen diferentes anomalías estructurales, ej. las sustituciones de aminoácidos que desestabilizan la cavidad de fijación para el heme en una cadena polipeptídica de la globina, las cuales incrementan la susceptibilidad de la molécula de

hemoglobina a la desnaturalización. Ya sea de manera espontánea o tras la exposición de los hematíes a un estrés oxidativo (ej. exposición a un fármaco sulfamídico), la Hb desnaturalizada se precipita y se une a la membrana celular, formando los cuerpos de Heinz, que dan lugar a que el hematíe sea ingerido por los fagocitos mononucleares, con el consiguiente desarrollo de una anemia hemolítica [72, 83, 84, 91, 100].

4) Acumulación de metahemoglobina.

En las raras hemoglobinas M, la sustitución de un aminoácido en una cadena de globina favorece la tendencia del hierro a oxidarse para formar metahemoglobina [52]. Puesto que esta no puede fijar oxígeno, el estado homocigoto es incompatible con la vida, el individuo heterocigoto tiene cerca de un 40% de Hb M, y la manifestación clínica principal consiste en una cianosis persistente [25].

5) Afinidad anormal por el oxígeno.

Este cuadro surge por la existencia de una Hb anormal, con sustitución de un aminoácido de la globina, lo que da lugar a un aumento de la afinidad del heme hacia el oxígeno. La Hb anormal fija el oxígeno tan fuertemente que éste deja de liberarse normalmente en los tejidos, al caer la presión parcial de oxígeno en los capilares. Los tetrámeros Hb H (β^4) y Hb Bart's (γ^4) fijan asimismo el oxígeno tan intensamente que no pueden ejercer la función de proteínas transportadoras del oxígeno [72, 84].

4.2.7.1. Hemoglobinopatías Estructurales.

Son el resultado de una mutación (en general sustitución de un aminoácido por otro), a nivel de una de las cadenas de globina (α o β). Asimismo se han descrito mutaciones de las cadenas δ y γ siendo éstas mucho más raras. Las hemoglobinopatías estructurales se transmiten hereditariamente con carácter autosómico, por lo que en el estado homocigoto no existe Hb normal y solo hay la Hb anómala, mientras que en el estado heterocigoto existe un 50% de la HbA y un 50% de Hb anómala, si la mutación afecta la cadena β ;

y un 70% de HbA y un 25% de Hb anómala, si la mutación afecta a la cadena α (Tabla 4-9) [37, 63, 94].

Tabla 4-9. Principales cuadros drepanocíticos [72].

Diagnóstico.	Genotipo β	Patrón de hemoglobina
Rasgo de células falciformes.	$\beta^A\beta^S$	HbA > HbS
Anemia de células falciformes.	$\beta^S\beta^S$	HbS, no HbA
Enfermedad SC	$\beta^S\beta^C$	HbS = HbC
Talasemia-Drepanocitosis.	$\beta^S\beta^0$	HbS, no HbA
Otras hemoglobino-patías estructurales (Hemoglobinas inestables)	$\beta^S\beta^+$	HbS > HbA

β^0 indica un gen talasémico que bloquea completamente la síntesis de cadena.

β^+ indica un gen talasémico que limita, pero que no bloquea completamente dicha síntesis.

i) Anemia de Células Falciformes.

La anemia drepanocítica es una anemia hemolítica producida por la homocigosis de los genes de los hematíes falciformes. Se encuentra casi exclusivamente en los individuos de raza negra [37, 72, 101].

En la HbS, el ácido glutámico del aminoácido en la sexta posición sobre la cadena β es sustituido por valina ($\alpha_2\beta_2^{S-Glu-Val}$). Esta sustitución se efectúa en la superficie de la molécula y cambia su carga, de ahí su movilidad electroforética. La HbS es libremente soluble cuando está completamente oxigenada; cuando se elimina el oxígeno de la HbS, aparece la polimerización de la Hb anormal formando tactoides (cristales líquidos) que son rígidos y deforman la célula dándole la forma

falciforme proceso que ocurre cuando los hematíes contienen la Hb S en cantidad superior al 20%. [18, 34, 37]. En la enfermedad de HbS homocigótica aparece la drepanocitosis en tensiones fisiológicas del oxígeno, y la rigidez de los hematíes es responsable de la hemólisis así como de la mayoría de las complicaciones. Las células rígidas son más vulnerables a los traumatismos y son fácilmente atrapadas por el sistema retículo endotelial, en especial por el bazo, lo que explica la hemólisis [34, 69].

La enfermedad de células falciformes no es de una sola patofisiología, existen factores que afectan el comienzo, la gravedad y los resultados clínicos de la formación de drepanocitos como son:

1) El porcentaje de HbS y HbF: Los individuos con rasgos de HbS en cuya sangre hay un porcentaje de la misma inferior al 50%, son generalmente asintomáticos. En individuos de genes homocigotos de HbS, el porcentaje de ésta puede llegar del 70% al 99%. Hay una correlación inversa entre el % de HbF y la gravedad de los síntomas clínicos. Existe una distribución heterogénea de HbF en los hematíes S-S homocigotos, a mayor cantidad de HbF es menor la formación de células en hoz. Está demostrado el efecto protector de la HbF, en individuos que son heterocigotos para la HbS y la Persistencia Hereditaria de la HbF (PHHF). Dichos individuos tienen un % mayor del 50% de HbS pero también poseen una gran cantidad de HbF, homogéneamente distribuida en los hematíes [5,99].

2) La tensión de oxígeno: Siendo éste el más importante determinante fisiológico para la gelación de HbS. La polimerización ocurre solamente con desoxigenación [101]. Estudios in vitro indican que la tensión de oxígeno en la sangre se acerca a la proporción de 35 a 45 mmHg, la cual debe disminuir más para inducir la formación de hoces en individuos que tienen rasgos drepanocíticos. También es evidente que para la formación de drepanocitos in vivo es necesario que la sangre este desoxigenada [99].

3) Distribución homogénea de densidad celular: Morfología y tipo de distribución de Hb en las células [87].

a) Células falciformes irreversibles (con HbS de 70 a 90%). Estas células son deformadas y no recuperan la forma normal al ser

expuestas al oxígeno. La existencia de esta forma, en los hematíes proporciona un eslabón en un ciclo progresivo de deformación en drepanocitos, estasis, desoxigenación y mayor formación de éstos [5, 99].

b) Células falciformes reversibles (con HbS menor al 50%). Son células que revierten a su forma normal al ser expuestas al oxígeno [99].

4) pH: La formación de drepanocitos depende también del pH, con mayor formación a menor nivel de éste [99].

5) Fragilidad mecánica de las células falciformes: Factor importante en la hemólisis debido a un incremento de la cantidad de Hb libre en la sangre en pacientes con drepanocitosis indica que se produce lisis intravascular [99].

Estos y otros factores permiten la reconstrucción de un ciclo patológico, en el cual la desoxigenación conduce a la deformación de los hematíes [98, 99].

ii) Rasgo de Células Falciformes.

El término "rasgo", está referido al estado heterocigoto. Este es una combinación de HbA y HbS [69], es decir un gen β^S y otro β^A y carece de síntomas clínicos. Aunque la intensa desoxigenación origina que los hematíes adopten la morfología falciforme in vitro, el grado de dicha desoxigenación, resultante de la sangre a través de la microcirculación, no da lugar a la aparición de la mencionada morfología de un modo significativo in vitro [69, 72, 101]. La electroforesis de la Hb revela la presencia de aproximadamente 60 a 70% de HbA y 30 a 40% de HbS. La mayor proporción de HbA se cree que refleja la mayor afinidad de las cadenas α hacia las β^A que hacia las β^S . Los niveles de HbF no se encuentran elevados [72, 99, 101].

iii) Enfermedades SC ($\alpha_2\beta_2^{6-Glu-Lis}$).

Es un estado heterocigoto doble (2 hemoglobinopatías β), donde una cadena β anormal y diferente, heredada de cada progenitor ocasionando una interacción de la HbC con la HbS

produce una anemia hemolítica cuya gravedad puede ser variable (intermedia entre el rasgo y la enfermedad drepanocítica) [34, 47]. La HbC y la HbS se dan en cantidades iguales. La Hb fetal varía desde normal hasta un 7%. Dado que no se pueden formar cadenas normales, no hay HbA [34, 72, 101].

iv) Talasemia-Drepanocitosis.

1) Talasemia α -concomitante.

Aproximadamente un 15% de individuos de raza negra poseen un solo gen α en el cromosoma 16 (delección genética conocida como talasemia α_2). Por lo tanto, se tienen pacientes con anemia de células falciformes que al mismo tiempo sean homocigotos o heterocigotos para la talasemia α_2 [72, 101]. Debido a que la reducción de la concentración intracelular de Hb disminuye la tendencia de la HbS al pasar al estado de gel, los pacientes con anemia de células falciformes y talasemia α concomitante suelen hallarse algo menos endémicos que los que presentan solamente anemia de células falciformes [72].

Debido a que la síntesis limitada de las cadenas α acentúa el efecto de la mayor afinidad de éstas hacia las cadenas β^A que hacia las β^S , la combinación del rasgo de células falciformes y talasemia α_2 aumenta la diferencia entre los porcentajes de HbA y HbS hallados en los hematíes de las células falciformes. Así, un individuo con rasgo de células falciformes puede tener aproximadamente un 60% de HbA y un 40% de HbS siendo homocigoto para la talasemia α_2 dichas cifras pueden ser de 70 y 30% respectivamente [72, 101].

2) Talasemia- β -drepanocitosis.

Mientras que el gen de la talasemia α disminuye la expresividad del gen β^S , ésta aumenta por el de la talasemia β . La heterocigosidad doble para un gen β^S y para otro de la talasemia β aumenta la proporción de HbS en los hematíes y da lugar a enfermedad clínica. Si el gen de la talasemia β suprime totalmente la producción de β^A (Gen β^O), los hematíes no contendrán HbA, y la gravedad de la enfermedad clínica del paciente se acerca al estado homocigótico para la HbS, es decir,

anemia de células falciformes. Si en cambio, dicha supresión no es completa (Gen β^+), los hematíes contendrán aproximadamente un 15 a 30% de HbA con manifestaciones clínicas más leves que en la drepanocitosis [72, 101].

Otras hemoglobinopatías estructurales.

1) Hemoglobina C ($\alpha_2^A \beta_2^{66\text{Glu}\rightarrow\text{Lis}}$). En la HbC, el ácido glutámico de la sexta posición N-terminal de la cadena β es sustituido por lisina [18, 47, 99, 101]. El individuo heterocigoto para el gen de la HbC no sufre enfermedad clínica, en estos casos se observan células en diana en la extensión de sangre periférica y, HbA y HbC en la electroforesis [72]. El individuo homocigoto para este gen padece una enfermedad hemolítica leve, en la morfología se presenta una combinación de células en diana y una población de células pequeñas distorsionadas y de aspecto plegado [18, 72].

2) Hemoglobina D ($\alpha_2\beta_2^{121\text{-Glu}\rightarrow\text{Gln}}$). Resulta de una sustitución del ácido glutámico por glutamina en la posición 121 de la cadena β [10].

El estado heterocigoto no origina síntomas. La Hb anormal representa entre un 35 y 50 % de la Hb total [99].

3) Hemoglobina E ($\alpha_2\beta_2^{26\text{-Glu}\rightarrow\text{Lis}}$). Es una mutación de la cadena β . En los heterocigotos constituye del 30 al 45 % de la Hb total, estos individuos son asintomáticos. Los individuos homocigotos para la Hb E tienen una anemia benigna, caracterizada por microcitosis y formación de hematíes en diana [74, 99].

4) Hemoglobinas Inestables. Son aquellas hemoglobinas que se desnaturalizan y precipitan dentro del hematíe en presencia de ciertas condiciones físicas (temperatura o agentes químicos) [18, 91] en forma de cuerpos de Heinz. Esta enfermedad es conocida como anemia hemolítica congénita con cuerpos de Heinz (Tabla 4-10). Los precipitados de cuerpos de Heinz atacan a la membrana del hematíe afectando y disminuyendo la permeabilidad de ésta. Las células no son hábiles para atravesar el bazo, y mientras el bazo elimina los cuerpos de Heinz, los hematíes hipocrómicos prematuros son dañados y destruidos produciendo hemólisis [91, 100].

La inestabilidad de la molécula de Hb puede ser causada por:

- 1) Sustitución de aminoácidos que afecten los sitios de interacción con el heme. En general este tipo de hemoglobinopatías tienen la mutación estructural a nivel de la cavidad del heme (deleciones o cambios de a.a. en íntima relación con este grupo), por lo que su desnaturalización va precedida de la pérdida del grupo heme o deshemización espontánea [18].

- 2) Sustituciones en los puntos de contacto entre las cadenas α y β (particularmente en la unión $\alpha\beta_1$). La mayoría de las hemoglobinas inestables son pertenecientes a la cadena β [69].

- 3) Sustitución de aminoácidos no polares en el interior de la molécula.

- 4) Deleciones o elongaciones en la estructura primaria.

- 5) Sustitución con prolina [69].

La enfermedad es inherente como un estado autosómico dominante y todos los pacientes son heterocigotos. El estado homocigoto no es compatible con la supervivencia [69].

Tabla 4-10. HEMOGLOBINAS INESTABLES

Cadena β	Cadena α
Hb Zurich	Hb Sinai
Hb Köln	Hb Bibba
Hb Genova	Hb Torina
Hb Sydney	
Hb Hammersmith	
Hb Freiburg	
Hb Gun Hill	
Hb Porto Alegre, etc.	

4.2.7.2. Talasemias.

El término talasemia abarca un grupo heterogéneo de trastornos hereditarios que habitualmente conducen a la instauración de una anemia microcítica hipocrómica [47, 84, 99]. La característica común de este grupo de enfermedades es la producción alterada de una de las cadenas polipeptídicas de la hemoglobina, es decir, el índice de síntesis está disminuido en un grado variable, pero la cadena formada es normal en cuanto a su estructura [18, 34, 69, 99]. Estos síndromes se clasifican mejor según sea la cadena polipeptídica afectada, por lo tanto, existen las talasemias α , β , δ , y $\delta\beta$, con una síntesis disminuida de sus respectivas cadenas, siendo las más comunes las talasemias α y β [45, 99].

Las formas severas y leves de la enfermedad pueden ser designadas como Talasemias Mayor (forma homocigótica) y Talasemia Menor (forma heterocigótica), basadas en el grado de anemia y complicaciones sistémicas [47].

En los síndromes Talasémicos β graves, la médula ósea muestra una notable hiperplasia eritroide, pero las células en desarrollo que contienen precipitados de α_1 son tan defectuosas que la mayoría se destruyen en la médula ósea antes de su liberación o en el bazo poco después de ésta (eritropoyesis inefectiva) [72].

Patofisiología de la Talasemia.

El defecto genético en la talasemia resulta de mutaciones que dificultan ampliamente o impiden la síntesis de una de las cadenas de globina. Estas mutaciones pueden ser de 2 tipos:

1) Mutaciones que suprimen o reducen en alto grado la síntesis de la cadena, sin alterar la secuencia de sus aminoácidos. La escasa cantidad de cadena polipeptídica que puede elaborarse tiene una estructura normal. Estas mutaciones pueden ser consecuencia de lo siguiente:

a) Delección de un gen, que es responsable de la mayoría de

los casos, aunque no de todos, de supresión de la cadena α (Talasemia α) [72].

b) Sustitución de una sola base, o deleciones de una o más bases en un gen, por lo demás intacto, que explica la mayoría de los tipos de talasemia β . Estas mutaciones, tienen lugar en puntos importantes para la transcripción, procesado, estabilidad o transporte nuclear-citoplásmico del ácido ribonucleico (RNA). Puesto que no afectan la secuencia de nucleótidos del RNA maduro trasladado, sea el que fuere éste, no afecta la estructura de la cadena polipeptídica [72].

- 2) Mutaciones que reducen la síntesis de la cadena y al mismo tiempo dan lugar a una cadena polipeptídica estructuralmente anormal (ej. HbE y Hb Lepore) [72, 83].

I) Talasemias Mayores.

A) α -Talasemias. La mayoría de las talasemias α derivan de deleciones del gen α . Las células diploides normales contienen 4 genes, la deleción de un sólo gen α no provoca manifestaciones clínicas. Si dicha deleción tiene lugar en los 4 genes α , el niño nace con síndrome de *hydrops fetalis*; en este caso, la hemoglobina consta de tetraméros de γ_4 (Hb Bart's) los cuales, debido a su elevada avidéz por el oxígeno no pueden funcionar correctamente como proteínas transportadoras de éste [1, 45, 69, 72].

Mecanismo de Hemólisis.

Una característica de la α -talasemia, es el hecho de que la producción disminuída o ausente de cadenas α podría resultar en exceso de cadenas γ durante la vida fetal y en el nacimiento, y un exceso de cadenas β después de éste. Esto causa la formación de tetraméros inestables, tales como γ_4 o Hb Bart's y β_4 o HbH, ambas presentan incrementada afinidad por el oxígeno, resultando una oxigenación pobre de los tejidos, lo cual establece tetraméros no funcionales que precipitan dentro de los hematíes viejos formando cuerpos de inclusión (cuerpos de Heinz) [47, 72];

los hematíes que contienen estos precipitados pierden su carácter deformable, lo que produce su lesión en la microcirculación y rápida eliminación por los fagocitos mononucleares provocando una disminuída supervivencia del hematíe y en el cual se induce una crisis hemolítica durante procesos infecciosos [47, 69, 72].

Formas de α -Talasemia.

1) Hb Bart's (Síndrome de *hydrops fetalis*). Es una enfermedad letal causada por la homocigosidad del gen talasémico α (delección de los 2 genes α del cromosoma 16) [69, 72] y los infantes con este síndrome mueren dentro del útero o antes del nacimiento. Ellos no producen cadenas α , y solamente las hemoglobinas encontradas son la Hb Bart's (γ_4) y Hb Portland ($\delta_2 \gamma_2$); debido a que la Hb Bart's es ineficiente como acarreador de oxígeno, la supervivencia de estos fetos dentro del tercer trimestre o hasta el nacimiento es completamente debida a la presencia de Hb Portland [69, 101].

2) Enfermedad de HbH. Es la consecuencia de la delección de 3 genes, en donde solamente un gen α de los 4 es funcional. Esta enfermedad es el resultado de una doble heterocigosidad de un gen talasémico α_0 con un gen talasémico α^+ (delección de un sólo gen α del cromosoma 16) [69, 72], asimismo también se han encontrado como resultado de homocigosidad de una forma más severa del gen α^+ [69]. Esta hemoglobina es muy inestable, precipita por diversos agentes (oxidantes, sulfonamidas, etc.), e incluso precipita con facilidad almacenada a 4°C [18, 69, 101].

B) β -Talasemias (Enfermedad de Cooley, Anemia Eritroblástica, Anemia Mediterránea, Anemia de Células en Diana). La β -talasemia mayor resulta de una homocigosis o doble heterocigosis de un gen anormal [47]. La talasemia β puede originarse por diferentes tipos de mutaciones. En algunos casos interviene un mecanismo de delección: del gen β solo, de los genes β y δ (talasemias $\beta\delta$), o de los β , δ y A_γ (Talasemia $A_\gamma\delta\beta$). Sin embargo, en la mayoría de los casos la talasemia β deriva de mutaciones en un punto concreto (sustituciones de un solo nucleótido o delecciones en el gen β que producen defectos en la transcripción, procesado o transporte del RNA mensajero de las cadenas β) [1, 47]. La

mutación puede suprimir completamente la síntesis de cadena β (Talasemia β^0) o bien dificultar dicha síntesis, pero sin impedirlo del todo (Talasemia β^+). El desarrollo de oligonucleótidos de DNA sintéticos específicos para las secuencias anormales de los nucleótidos en diversas mutaciones concretas de la talasemia β permite actualmente efectuar el diagnóstico prenatal de una serie de variantes de éstas [45, 69, 72, 88].

Mecanismo de Hemólisis.

Son descartadas muchas teorías concernientes al mecanismo por el cual la talasemia produce supresión de la síntesis de hemoglobina, por el hecho de que la supresión es específica para una cadena polipeptídica dada. Por tanto, la β -talasemia produce una disminución específica de la síntesis de la cadena β [99]. Una producción de cadenas γ compensa la pérdida de cadenas β resultando un incremento de HbF (20 al 90%), la HbA₂ puede ser normal o incrementada [45, 47, 51, 83].

En el caso de la β -talasemia, se sugiere que pueden acumularse cadenas α libres y que éstas ejercen un efecto adverso sobre la membrana de los hematíes y su permeabilidad. De tal manera, las mitocondrias de los eritroblastos se cargan de hierro y existe la posibilidad de que esto produzca una afectación de la síntesis de ATP y una destrucción intracelular [99], de tal forma que se produce hemólisis de los precursores del hematíe en la médula ósea, resultando en una eritropoyesis inefectiva y originándose una anemia usualmente severa [47, 69].

II) Talasemias Menores.

A) α -Talasemias Heterocigotas.

i) Hemoglobinopatía H (α -talasemia intermedia o α -talasemia-1-heterocigótica). La HbH es un tetrámero β_4 , y en los pacientes adultos existe en la sangre periférica en una proporción del 5 al 25%. En los niños se puede encontrar la Hb Bart's (tetrámero γ_4), la cual casi desaparece al mismo tiempo que normalmente lo hace la HbF, permaneciendo una pequeña cantidad en el adulto. El cuadro clínico es menos severo que en la

enfermedad de Cooley [18, 45, 101].

ii) Portadores del gen (α -talasemia-2-heterocigótica). Son portadores relativamente sanos o sólo escasamente anémicos que ofrecen rasgos talasémicos [18, 101].

B) β -Talasemia heterocigota (Enfermedad Rutti, Greppi, Michelli o anemia de Cooley benigna). Los estados heterocigotos de los genes β^0 o β^+ constituyen el genotipo común de talasemia menor [101]. Esta talasemia menor se debe a una depresión heterocigótica de la producción de las cadenas [84]. Se presenta generalmente en adultos en países mediterráneos que son portadores de la enfermedad con cierta tendencia a la hemólisis. Generalmente los pacientes son asintomáticos, las alteraciones son más moderadas que en la enfermedad de Cooley [18, 88, 101].

III) Síndromes similares a las Talasemias.

A) δ - β -Talasemias y Síndrome de Hemoglobina Lepore.

La hemoglobina Lepore (Hb Lepore), es una hemoglobina de estructura anormal en la que la cadena α es normal y la cadena no α está formada por una sección de la cadena δ y una sección de la cadena β . Tiene la movilidad electroforética de la HbS en pH alcalino pero no forma drepanocitos.

La Hb Lepore es considerada parte del síndrome de δ - β -Talasemia porque su concentración parece fijarse en un nivel bajo y hay ausencia de síntesis normal de cadenas δ y β . La Hb Lepore se produce en formas homocigóticas y heterocigóticas asociadas a β -Talasemias y variantes de β -hemoglobina (HbS y HbC) [84, 101].

B) Persistencia Hereditaria de HbF (PHHF).

Consiste de un grupo de condiciones caracterizadas por la retención de HbF en el adulto (15 al 30% de Hb total) y una producción disfuncional o ausente de cadenas δ y β [5, 47, 69]. La diferencia en sus propiedades físicas consiste en que tiene mayor afinidad por el oxígeno, menos carga positiva en soluciones a pH 8.6 y en su resistencia a la desnaturalización por álcalis [102]. La movilidad de la Hb F es muy semejante a la Hb del adulto (Hb A) en la electroforesis sobre los sistemas tamponados

habitualmente para el análisis de hemoglobina. Su posición en la tira electroforética es demasiado proxima a la de la Hb A para llevar a cabo una separación y cuantificación adecuada [62, 84, 94, 99].

La PHHF se clasifica en dos categorías diferentes de acuerdo a la distribución de Hb F en los hematíes:

1) PHHF pancelular, en la cual la Hb F está uniformemente distribuída en los hematíes. Parece ser una forma de talasemia δ - β en la cual los genes γ no son entrecruzados y no son hábiles para compensar la falta de producción de cadenas δ y β [5, 69, 84].

2) PHHF heterocelular, en el cual la HbF se encuentra en una porcentaje pequeño de las células. En el adulto normal, las células conteniendo HbF pueden ser encontradas ocasionalmente, pero la cantidad es siempre menor del 2% y es usualmente menor del 1%. Estas células son llamadas células F. La PHHF heterocelular es una condición inherente en la cual el número de células F está incrementado sin circunstancias anormales en la producción de cadenas β y δ [5, 64, 84].

Clínicamente los homocigotos pueden demostrar hallazgos de talasemia menor y los heterocigotos pueden ser hematológicamente normales [69, 84, 101].

Existen algunas técnicas relativamente sensibles para la investigación de hemoglobinopatías patológicas por alteraciones de sus globinas y de sus cadenas de aminoácidos que nos permiten detectar una fracción anómala y clasificarla dentro de un grupo determinado aunque en muchos casos resultan insuficientes para precisar el tipo exacto de la misma. Las más usuales y aplicadas son las siguientes:

- a) Técnicas electroforéticas sobre papel o acetato de celulosa, isoelectroenfoque en geles de poliacrilamida.
- b) Prueba de detección seriada para hemoglobina falciforme.
- c) Técnica de la desnaturalización alcalina.
- d) Prueba de estabilidad al calor de las hemoglobinas inestables.
 - i) Métodos microscópicos (cuerpos de Heinz) en hemoglobinas inestables.

- e) Medición de la solubilidad.
- f) Técnicas nuevas como el estudio de las curvas de oxigenación, del efecto Bohr y la influencia del pH de ciertas enzimas [18].

4.2.7.3. Electroforesis de Hemoglobinas.

Las hemoglobinopatías constituyen un grupo de enfermedades caracterizadas por producción de hemoglobinas con moléculas anormales. Las sutiles modificaciones de origen genético en la molécula de hemoglobina pueden reconocerse por métodos químicos en uno o dos casos, ej. se reconoce la HbF por su mayor resistencia a la desnaturalización con álcalis, pero para identificar y separar los otros miembros del grupo, se suele usar la electroforesis [56].

Una valoración de un paciente con un posible trastorno de la hemoglobina debe incluir la electroforesis de un hemolizado para detectar una hemoglobina anormal, cuantificación de HbA₂ y HbF y ulteriores exámenes especializados para definir cualquier anomalía existente [99].

La electroforesis es un método mediante el cual, las moléculas cargadas en solución principalmente proteínas y ácidos nucleicos, migran en respuesta a un campo eléctrico. Su rango de migración o movilidad, a través del campo eléctrico, depende de la fuerza del campo, de la carga neta, tamaño y forma de las moléculas; y también de la fuerza iónica, viscosidad, y de la temperatura del medio en el cual las moléculas se mueven. Es una herramienta analítica y un método simple, rápido y altamente sensible. Es usada en el estudio de las propiedades de especies de una sola carga y también como técnica de separación. El método se lleva a cabo en geles contenidos en tubos, placas o en superficies horizontales [39].

La diferencia estructural entre las hemoglobinas A, F, y C, no es sino la sucesión de aminoácidos en una región de las cadenas peptídicas que las componen. En el caso de la HbA, el sexto aminoácido del grupo es ácido glutámico, de carga negativa.

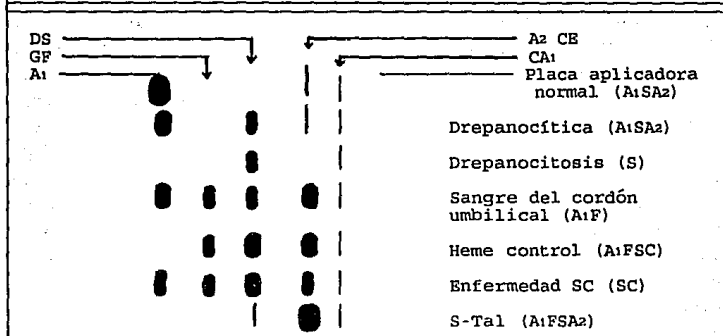
En la HbS, este aminoácido es valina, eléctricamente neutro; en la HbC, es lisina, con carga positiva. Estas diferencias de carga eléctrica modifican la movilidad de las hemoglobinas en un campo eléctrico (electroforesis), lo que permite su separación [56, 57]. Por lo anterior, dado que las hemoglobinas son proteínas, éstas se comportan como compuestos anfotéricos, conteniendo ambos residuos ácidos y básicos. Su carga neta es determinada por el pH del medio que las contiene. La mayoría de la carga de las proteínas resulta de la ionización dependiente del pH de los grupos carboxilo y amino ($-\text{COOH} \rightleftharpoons \text{COO}^- + \text{H}^+$; $-\text{NH}_2 + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{NH}_3^+$). Cada proteína tiene características propias, las propiedades de carga dependen del número y tipo de aminoácidos que llevan los grupos amino y carboxilo [39]. Existe un pH en el cual no existe carga neta sobre la proteína, este pH es llamado punto isoelectrónico (pI). Cada proteína tiene un pI propio, ej. el pI de la hemoglobina humana es de 7.07; el de la β -lactoglobulina es de 5.34. En una solución en la cual el pH está por arriba de este pI, la proteína presenta una carga neta negativa y migra hacia el ánodo en un campo eléctrico. por debajo de este pI, la proteína es positiva y migra hacia el cátodo. El pH de una solución en un sistema de electroforesis puede permanecer constante para mantener la carga, por lo tanto, la movilidad de las proteínas. Por esta razón la solución usada en la electroforesis debe de ser buferada [39].

La electroforesis en una solución alcalina tamponada (pH 8.6 a 8.8), es el principal método de diferenciar las hemoglobinas anormales de la hemoglobina adulta normal (HbA). El medio de soporte puede ser acetato de celulosa, gel de almidón, papel, bloque de almidón o agarosa. La electroforesis en acetato de celulosa es el método de elección para el laboratorio clínico en general, debido a la disponibilidad comercial del material, facilidad de preparación y rapidez de análisis (Tabla 4-11) [99].

El uso de acetato de celulosa es adecuado para detectar las hemoglobinopatías comunes, la electroforesis sobre gel de almidón proporciona una mejor resolución de las hemoglobinas [99]. La electroforesis en gel de agar a pH 6.2 es útil para diferenciar la HbS de la HbD y la HbC de la HbO y HbE. La electroforesis en

gel de almidón a pH 6.8 a 7.0 separa claramente la HbH y la Hb Bart's de todas las demás hemoglobinas [99].

Tabla 4-11. Velocidades electroforéticas relativas de las diversas hemoglobinas en diferentes condiciones [84].



Medio de soporte; amortiguador y pH: Acetato de celulosa, amortiguador tris-EDTA-borato, pH 8.6.

El acetato de celulosa es el soporte ideal por su carácter homogéneo y no absorbente así como por su elevada resistencia mecánica que le confiere una fácil manipulación. Tiene la ventaja de ser completamente soluble en ácido etanoico concentrado, lo que permite eluir las fracciones separadas y analizarlas cuantitativamente por colorimetría. Cualitativamente, esta técnica permite la separación de las hemoglobinas normales de un hemolizado (A, A2, F), así como determinados mutantes estructurales (HbS, HbE, HbJ). El agar forma geles rígidos a concentraciones del 1.0%. Resulta muy manejable y especialmente útil, ya que permite separar la HbS de la HbD y la HbC de la HbE, trabajando a un pH ácido [84, 94].

-continúa en la siguiente hoja.

Tabla 4-11 (Continuación)

F	S	GDA	Carácter en hoz C
			Normal (A ₁ A ₂).
			(A ₁ -S A ₂) (drepanocítico).
			Enfermedad drepanocítica (S).
			Sangre del cordón umbilical (A ₁ F).
			Heme control (A ₁ FSC)
			S-Tal (A ₁ FA ₂).
			Enfermedad C.

Medio de soporte; amortiguador y pH: Agar gel, amortiguador fosfato o citrato, pH 6.2.

La electroforesis en gel de agar (citrato pH 6.2) permite diferenciar perfectamente la HbA de la HbF lo cual resulta difícil mediante la electroforesis sobre acetato de celulosa a pH 8.6. Asimismo, resulta útil para diferenciar perfectamente ciertas hemoglobinas patológicas entre sí, como la HbS de la HbD [84, 94].

		HbA, Hb Bart
		HbA
		HbA ₂ , HbA, Hb Bart traza, HbH
		HbA ₂ , HbA, Hb Bart, HbH
		Sangre del cordón umbilical (sin HbA ₂ , HbF y HbA no están separadas).

Medio de soporte; amortiguador y pH: Gel de almidón, papel, soporte de almidón, agarosa y barbital pH 8.6; amortiguador tris-EDTA-borato, pH 8.6.

Método satisfactorio para identificación de HbA₂, A, F y C y D (G) [84].

El gel ha demostrado ser más útil para presentar una mejor resolución de las fracciones es el de poliacrilamida, que separa las distintas moléculas de hemoglobinas de acuerdo a su pI, además es utilizado como soporte en la técnica de isoelectroenfoque (IEF), en esta técnica el conocimiento del pI y de la carga de las hemoglobinas a diferentes valores de pH es de interés para su caracterización y para predecir su comportamiento electroforético [57].

Isoelectroenfoque en geles de poliacrilamida.

La separación de hemoglobinas es importante en varias áreas de investigación biomédica, pero con frecuencia es difícil debido a las pequeñas diferencias de sus propiedades fisicoquímicas. Las técnicas de separación más comúnmente usadas son cromatografía de intercambio iónico y electroforesis, especialmente en gel de almidón o gel de poliacrilamida, los cuales son apropiados para al análisis de rutina de múltiples muestras [42].

La combinación de varias electroforesis sobre agar y acetato de celulosa a diferentes pH, en presencia o ausencia de urea, parece ser más efectiva para la identificación de varias mutantes de hemoglobina. Sin embargo, este procedimiento necesita de varias electroforesis en cada muestra y los resultados algunas veces son difíciles de interpretar [7].

Una técnica en pequeña escala para IEF en geles de poliacrilamida fue utilizada para separar hemoglobinas en hemolizados humanos. Las hemoglobinas fueron purificadas cromatográficamente y usadas como estándar para identificar componentes en los hemolizados humanos. Los resultados indicaron que esta técnica ofrece un significativo avance para la separación de hemoglobinas de alta resolución, siendo un método para la caracterización de variantes de hemoglobina [42].

EL IEF ofrece un método alternativo para la separación de proteínas sobre las bases de su carga superficial, y bajo condiciones adecuadas, puede detectar proteínas cuyo pI difiere tan solo en 0.02 unidades de pH. El potencial de esta técnica para separar hemoglobinas fué demostrado por Svensson quien

desarrollo gradientes de pH por electrólisis mediante el acarreo de anfolitos en gradientes de densidad de sacarosa [42].

El electroenfoque en gel es una extensión de la técnica de gradiente de densidad y está basado en el mismo principio de separación. La sustitución del gradiente de sacarosa por el gel de poli(acrilamida) como medio de soporte hace el procedimiento más apropiado para la separación analítica de muchas muestras pequeñas. Algunos resultados indican que el electroenfoque en gel da superior resolución que la técnica de gradiente de densidad de sacarosa y también ofrece considerable ahorro de tiempo y material [43].

El IEF es un método en el cual las proteínas son separadas en un gradiente de pH de acuerdo a sus pI, estos son los pH en los cuales la carga neta de la molécula de proteína es cero. En este pH, las moléculas de proteína no tienen movilidad electroforética [23, 75].

El enfoque ocurre en dos estados:

- 1) Formación de gradiente de pH, en este estado, un gel no restrictivo es polimerizado, este gel contiene una mezcla de compuestos anfotéricos altamente móviles llamados anfolitos. Para generar el gradiente, el voltaje es encendido, y los anfolitos son colocados de acuerdo a sus propios pI, el más ácido se mueve hacia el ánodo y el más básico hacia el cátodo [39].
- 2) En el segundo estado, las proteínas comienzan su migración hacia el ánodo si su carga neta es negativa, o hacia cátodo si su carga es positiva. La muestra de proteínas es aplicada a la mezcla de polimerización o bien puede ser aplicada al gel antes de generar el gradiente de pH. Cuando una proteína alcanza este pI en el gradiente de pH; ésta lleva una carga neta de cero y podría darse fin a la migración [39].

Tipos de Isoelectroenfoque:

- 1) IEF horizontal en unidades frías.

Es el más comúnmente empleado, ofrece la posibilidad de correr muchas muestras sobre un solo gel, lado por lado. En una unidad horizontal se puede usar poli(acrilamida) o agarosa (Fig. 4-15) [77].

2) IEF en unidades verticales frías.

En este método el CO₂ no hace contacto con la superficie del gel vertical, el CO₂ causa la acidificación sobre la porción final básica del gradiente de pH, imposibilitando concentrar las proteínas básicas, tales como las proteínas ribosomales. Esta característica le permite correrse a altos voltajes [29, 39].

3) IEF en geles de acrilamida en tubos.

Los geles en tubo contienen un grosor de 3 a 5 mm lo cual hace la disipación más lenta. Esto significa que el enfoque en geles en tubo debe ser corrido a voltajes bajos durante un largo tiempo [39]. Esta restricción puede ser corregida por IEF en capa fina a alto voltaje proporcionando las condiciones requeridas para el desarrollo de una técnica aplicable a la determinación [7].

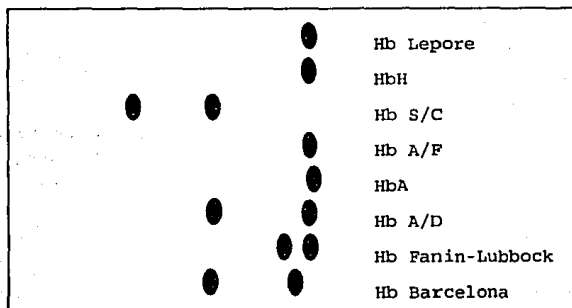


Fig. 4-15. Imagen característica de una separación de hemoglobinas mediante isoelectroenfoque horizontal en unidades frías [94].

4.2.7.4 Prueba de Detección Seriada para Hemoglobina Falciforme.

1) Prueba Microscópica del Metabisulfito Sódico al 2% (Jean Atwater, Allan J. Erlev)

Fundamento:

El fenómeno de la formación de células falciformes se demuestra mediante la privación de O₂ a los hematíes, tapando con un cubreobjetos la preparación, en el cual se forman "tactoides" que son responsables de la forma de los hematíes. Esta cristalización intraeritrocítica es responsable de la birrefringencia de las células drepanocíticas en los preparados húmedos, de la condensación de hemoglobina en el centro de la célula drepanocítica en los frotis teñidos [84, 99]. Para acelerar la reacción se emplean gran cantidad de sustancias reductoras, comúnmente se usa el metabisulfito sódico al 2% [99, 101].

Material:

Portaobjetos de cantos pulidos.

Cubreobjetos.

Pipetas Pasteur.

Microscopio óptico (Binocular Rossbach).

Baño María a 37°C.

Termómetro (escala 0° a 100°C).

Caja de Petri de vidrio.

Material Biológico

Sangre completa.

Reactivos (Anexo 1):

Solución de metabisulfito sódico al 2% recientemente preparado.

Sal sódica de EDTA al 5%.

SSF al 0.85%.

Método [34]:

Sobre un portaobjetos se mezclan una gota de metabisulfito sódico ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) al 2% con una gota de sangre completa (diluída 1:5 con SSF).

Realizar a la vez un control, el cual consiste de una mezcla de una gota de SSF y una gota de sangre completa (diluída 1:5 con SSF).

Colocar un cubreobjetos sobre cada una de las preparaciones anteriores, presionar suavemente para formar una fina película. Secar el exceso con una gasa. Guardar en una cámara húmeda a 37°C durante 5 min.

Observar inmediatamente las preparaciones en el microscopio con el objetivo seco de gran aumento (40x). La formación de células falciformes se observa mejor en el borde del cubreobjetos. Mantener la preparación en cámara húmeda a 37°C y volver a observar en el microscopio a los 30 min. Seguir la incubación en cámara húmeda a 37°C para efectuar un último examen a las 2 horas antes de concluir que la prueba es negativa.

Informe de resultados:

Positivo: Las células parcialmente falciformes presentan la forma de hoz.

Negativo: Ausencia de células en forma de hoz.

Interpretación:

Las células con una cantidad corpuscular de HbS por encima del 7% sufrirán la transformación bajo las condiciones de la prueba. Este examen, sin embargo, no clasifica a las personas como portadoras de una forma homocigótica o heterocigótica de HbS. Es necesario tener presente que algunas otras hemoglobinas anormales ($\text{HbC}_{\text{Georgetown}}$, $\text{HbC}_{\text{Hartem}}$ o HbI) también forman células falciformes en ausencia de HbS [99].

En los niños con HbS el examen tal vez no sea positivo hasta transcurridos uno o dos meses de edad [99].

La preparación del control es útil cuando existe eliptocitosis o poiquilocitosis, especialmente en los casos de talasemia. Las células crenadas o con espículas se diferencian por la presencia de estas prolongaciones finas y por sus formas más bien redondeadas que alargadas [99].

Observaciones:

Causas de falsos negativos:

- a) Deterioración del agente reductor ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_2$ al 2%).
- b) Si la cantidad de HbS es pequeña para que se pueda detectar.
- c) Por la presencia de aire atrapado entre el portaobjetos y el cubreobjetos [34].

2) Prueba del tubo de Ditionita.

Fundamento [84]:

Los hematíes son lisados por la saponina, y la hemoglobina es reducida por la ditionita en un buffer de fosfatos. La HbS reducida se caracteriza por ser de muy baja solubilidad y por la formación de cristales líquidos hemáticos, de modo que en presencia de HbS o hemoglobinas no S drepanocíticas el sistema se enturbia.

Material:

Tubos de ensaye de 13 x 100 mm.

Gradilla metálica para tubos de ensaye de 13 x 100 mm.

Pipetas serológicas de 1 ml (1/100).

Pipetas serológicas de 5 ml.

Cronómetro.

Material Biológico:

Sangre fresca anticoagulada.

Reactivos (Anexo 1):

Tampon de fosfatos 2.36 M.

Reactivo precipitante: Saponina al 5% y Ditionita sódica al 20% recientemente preparado.

Método [34]:

Efectuar pruebas con sangre del paciente y sangre de un control normal.

Colocar 0.02 ml de sangre en tubo de ensaye de 13 x 100 mm.

Añadir 2 ml del reactivo precipitante.

Invertir el tubo 3 veces.

Incubar a temperatura ambiente durante 3 minutos.

Examinar la transparencia en el tubo.

Leer la prueba sosteniendo el tubo 2.5 cm de una escala lineal.

Incluir controles positivos y negativos respectivamente.

Informe de resultados:

Positivo: La solución se enturbia y las líneas por detrás del tubo no son visibles.

Negativo: Solución clara, permite ver las líneas a través del tubo.

Interpretación:

La opacidad indica una hemoglobina insoluble que casi siempre es HbS (o una Hb no S drepanocítica) en estado homocigoto, heterocigoto o heterocigoto mixto [34].

La sangre normal u otras hemoglobinas anormales son transparentes [34].

Observaciones:

Causas de falsos positivos:

- 1) Por el uso de demasiada sangre en relación con el reactivo como puede ocurrir en policitemia [84].
- 2) En trastornos con hemoglobinas inestables después de la esplenectomía, cuando existe gran número de cuerpos de Heinz [34].

3) En las alteraciones de las proteínas sanguíneas, tales como mieloma múltiple, debidas a precipitaciones de las proteínas plasmáticas [34].

Causas de falsos negativos:

- 1) Si el paciente presenta anemia grave con niveles de Hb menores de 7 g/dl. [76]. Es aconsejable duplicar la cantidad de sangre si el Hto. es menor de 30% [34].
- 2) Reactivos deteriorados [34, 84].
- 3) Interpretación inexacta de la escala de lectura [84].
- 4) Pequeñas cantidades de HbS como las que se ven después de transfusiones múltiples y en sangre del cordón umbilical [84].
- 5) Interferencia de altos niveles de HbF [84].

4.2.7.5. Prueba de Desnaturalización por Alkali.

Fundamento (Singer et al, 1951):

La prueba se fundamenta en que la hemoglobina del adulto se desnaturaliza rápidamente en presencia de una solución alcalina, cambiando de color; en cambio, la HbF tarda mucho en desnaturalizarse. La técnica consiste en añadir a la solución de Hb un reactivo alcalino y después un reactivo que precipite la Hb desnaturalizada, dejando en solución la Hb no cambiada [18].

Las lecturas de D.O. a 540 nm de la solución sobrenadante dan la medida de la cantidad de HbF presente en sangre [94].

Material:

Tubos de ensaye de 13 x 100 mm.

Gradilla metálica para tubos de ensaye de 13 x 100 mm.

Pipetas serológicas de 2 ml (2/100).

Baño María a 20°C.

Termómetro (0° a 100°C).

Espectrofotómetro (Baush and Lomb Spectronic 20).

Celda para espectrofotómetro 1=1cm.

Piseta.

Material Biológico:

Solución de Hb del paciente de 10 g/100ml de sangre (Hb primitiva): Se extraen 5 ml de sangre los cuales son colocados en un tubo de ensaye de 13 x 100 mm conteniendo sal sódica de EDTA. Homogenizar, centrifugar a 2500 rpm/10min. para extraer plasma, lavar los hematíes 4 veces con SSF al 0.85%. Lisar las células con un volumen igual de agua destilada seguida de vigorosa agitación y centrifugar a 5000 rpm/15min. Tomar el sobrenadante y analizar el contenido por el método de cianometahemoglobina y a base del valor hallado se ajusta a una concentración de 10 g/100ml.

Reactivos (Anexo 1):

Reactivo alcalino: Solución de hidróxido sódico 12 N pH=12.7
conservar en nevera en frasco parafinado.

Reactivo precipitante: Solución saturada de sulfato de amonio.

Método [18]:

En un tubo de ensayo de 13 x 100 mm (tubo R) se colocan 1.6 ml del reactivo alcalino, se deja reposar durante 10' en baño María a 20°C.

Se añaden a este tubo 0.1 ml de la solución de Hb de 10 g/100 ml, enjuagando la pipeta con el líquido del tubo (en el momento de verter esta solución poner en marcha el segundo de un reloj).

Agitar durante 10 segundos.

Al minuto se añade al tubo 3.4 ml de la solución precipitante, la cual bajara el pH del medio y precipitará la Hb desnaturalizada.

Mezclar invirtiendo 6 veces el tubo.

Efectuar la filtración de esta solución utilizando papel filtro Whatman No.42

Preparar un control añadiendo a 5 ml de agua destilada 0.1 ml de la solución de Hb primitiva (tubo C).

Leer los tubos R y C contra blanco de agua destilada a 540 nm registrar la D.O. (absorbancias de los tubos).

Cálculos:

$$\% \text{ de HbF} = \frac{\text{D.O. del tubo R}}{\text{D.O. del tubo C}} \times 100$$

donde:

D.O. del tubo C = al 100% de Hb total.

D.O. del tubo R = % de Hb F (álcali resistente).

Valores de referencia:

Valor normal en adulto: 2% de HbF

Valor dudoso 2 a 4% de HbF.

Significativo clínicamente: 4% de HbF [18].

Interpretación:

En una persona normal se encuentra menos de un 2% de HbF después de los dos años de edad. En la sangre umbilical los niveles de HbF se encuentran entre 65 y 90%; niveles que van decreciendo con el tiempo de forma que a la edad de 4 meses la HbF que se encuentra es inferior al 2% de la cantidad total de Hb.

Se han encontrado niveles de HbF entre el 2 y 5%, en algunos casos de esferocitosis hereditaria, anemia hipoplásica, leucemia aguda y crónica, anemia perniciosa no tratada y carcinoma con metástasis en la médula ósea.

Aproximadamente el 50% de los pacientes afectados de α -talasemia presentan cantidades de HbF entre el 2 y el 5%. En los pacientes homocigotos para la β -talasemia, la HbF se encuentra casi siempre elevada alcanzando niveles del 15 al 100%.

Los pacientes que son homocigotos para la HbS pueden no tener HbF o presentar niveles tan altos como el 20%, las personas heterocigotas para el gen presentan cantidades normales de HbF. Cuando la HbF alcanza el 15% en pacientes que no presentan otro trastorno hematológicamente aparente, debe sospecharse la presencia del gen para la PHHF [18, 84, 99].

Observaciones:

- a) Es importante correr un control positivo utilizando sangre fetal (del cordón umbilical) paralelamente con las muestras problema; el cual nos diferencia el color en la reacción en el tubo R.
- b) Debido a que el sulfato de amonio posee cierta reacción alcalina en el tubo R final la reacción es alcalina y la Hb continúa desnaturalizándose con cierta rapidez, por lo cual debe cambiarse el sulfato amónico usado, o bien, añadir una pequeña cantidad más de la solución de HCl al reactivo precipitante.
- c) El color del tubo R debe permanecer inalterable durante al menos una hora, lo cual ha de comprobarse en el espectrofotómetro [18].

4.2.7.6. Estabilidad de la Hemoglobina al calor
(Hemoglobinas Inestables).

Método de estabilidad al calor. (Dacie y cols., 1970).

Fundamento:

Determinadas hemoglobinas anormales son inestables y tienen tendencia a precipitar dentro de los hematíes. Pueden ser demostradas in vitro empleando la observación de que el calor intensifica esta precipitación [99]. La HbA en solución no precipita cuando se calienta a 50°C durante una hora o a 60°C media hora. Las hemoglobinas que se desnaturalizan parcial y fácilmente precipitan a esta temperatura [84]. Comparando la densidad óptica del sobrenadante antes y después del calentamiento permite el cálculo del % de hemoglobina inestable [99].

Material:

Tubos de ensaye de 15 x 100 mm.
Gradilla metálica para tubos de ensaye de 15 x 100 mm.
Pipetas serológicas de 1,2 y 5 ml.
Baño María a 50°C.
Termómetro (0° a 100°C).
Espectrofotómetro (Baush and Lomb Spectronic 20).
Celda para espectrofotómetro 1=1cm.
Cronómetro.
Tapones de hule látex.
Centrífuga (Mod. J-12).
Balanza granataria (Serie AC5664).
Piseta.
Gasas.

Material Biológico:

Sangre completa.

Reactivos (Anexo 1):

Sal sódica de EDTA al 5%.
Amortiguador isotónico a pH 7.4.
Solución de Dabkin.

Método [18]:

Extraer sangre con anticoagulante EDTA y determinar la concentración de Hb y Hto. (en caso de existir anemia centrifugar ligeramente la sangre y extraer el plasma hasta conseguir una Hb más o menos normal).
--

Homogenizar perfectamente.

Colocar 1 ml de esta sangre en un tubo de ensaye de 15 x 100 mm y lavar con 3 ml de SSF al 0.85% dos veces.

Decantar el sobrenadante del último lavado. Lisar el concentrado de hematíes con 5 ml de agua destilada, homogenizando hasta completa hemólisis.
--

Adicionar 5 ml de amortiguador isotónico de pH 7.4. Mezclar bien con agitación intensa.

Continuación del Método.

Centrifugar a 2500 rpm durante 10'.

Colocar 2 ml del sobrenadante en cada uno de tres tubos. Dos de estos tubos someterlos a incubación a 50°C, bien controlados. El tercer tubo dejarlo a temperatura ambiente.

Al término de una hora de incubación, observar si existe precipitación en los tubos incubados, en caso de que ésta exista se retira uno de los tubos; si no es así, continuar la incubación.

A las tres horas de incubación se retiran los tubos (los dos o el que quedaba) y observar si existe precipitación (normalmente sólo existe un pequeño precipitado a las tres horas de incubación. Si este precipitado es muy intenso o bien si existe precipitado en el tubo de la hora de incubación, es que existe Hb fácilmente precipitable o inestable).

Centrifugar los tubos turbios a 2500 rpm por 10'.

Determinar la concentración de Hb de los sobrenadantes por el método de la cianometahemoglobina: mezclando una parte del hemolizado con 19 partes de solución de Drabkin (1:20). El tercer tubo incubado a temperatura ambiente nos servirá de control, el cual se centrifuga y se realiza la dilución como a los tubos anteriores.

Leer la D.O. (absorbancias) de los tubos a 540 nm contra blanco de reactivo (5 ml de Drabkin y 0.25 ml de amortiguador).

Cálculo [35]:

$$\% \text{ de Hb inestable} = \frac{\text{D.O. Mtra. no calentada} - \text{D.O. Mtra. calentada}}{\text{D.O. Mtra. no calentada}}$$

Valor de referencia:

Normal: menor del 5% de Hb precipitará a 50°C.

Interpretación:

Mayores cantidades de precipitados, de un 10 al 40% del total, se encuentran en las hemoglobinopatías debidas a hemoglobinas inestables: Hb Torino, Hb Bibba, Hb Hammersmith, Hb Sydney, Hb H, Hb Kansa, Hb Tacoma, etc. [18, 84].

La prueba se encuentra positiva en las anemias hereditarias con presencia de corpúsculos de Heinz [34].

Observaciones:

- 1) Los buffers de fosfato retardan la precipitación de la Hb a 50°C y no deben ser empleados en esta prueba.
- 2) Debe dirigirse atención al color del precipitado:
 - a) Se halla un precipitado blanco cuando la inestabilidad de la hemoglobina es debida a una mutación en la zona cercana al heme que resulta en la pérdida de este grupo de la cadena protéica.
 - b) Se forma un precipitado pardo rojizo cuando las cadenas α y β se disocian más fácilmente de lo normal con unión normal del heme a la globina [99].

4.2.7.6.1. Método Microscópico de los Cuerpos de Heinz en Hemoglobinas Inestables.

Fundamento [99]:

Los cuerpos de Heinz adoptan un color púrpura cuando son expuestos a ciertos colorantes básicos (violeta de metilo o cristal violeta). Se ven más fácilmente cuando los hematíes están ligeramente distendidos por suspensión en una solución hipotónica.

Material:

Portaobjetos de cantos pulidos (limpios y desengrasados).
Cubreobjetos.
Pipetas graduadas 1/100 de 1 ml.
Microscopio óptico (Binocular Rossbach).

Material Biológico:

Sangre completa.

Reactivos:

Violeta de metilo 0.5g, ó Cristal violeta 2g, se disuelven en 100 ml de solución salina y se filtran.

Método [34]:

Se coloca en un portaobjetos 0.01 ml de solución colorante, por otro lado se colocan 0.025 ml de sangre en un cubreobjetos.

Se coloca el cubreobjetos sobre el portaobjetos de modo que la sangre se ponga en contacto con la solución colorante, incubar la preparación a temperatura ambiente/5 min.

Examinar al microscopio.

Informe de resultados:

Los cuerpos de Heinz se tiñen intensamente de color púrpura y su diámetro varía de 1 a 4 micrometros. Tienden a unirse a la membrana del hematíe.

Los reticulocitos no se tiñen con este colorante [34].

Interpretación:

Normalmente los hematíes no contienen cuerpos de Heinz. La presencia de éstos significa que existe una de las 3 situaciones siguientes:

- 1) El individuo muestra un defecto hereditario, una anemia hemolítica asociada con α -talasemia (HbH), y con varias hemoglobinas inestables tales como las hemoglobinas de Zúrich, Köln y Gun Hill [34, 99].
- 2) Se ha administrado al individuo (o a los hematíes in vitro), fenilhidrazina, colorantes o un compuesto nitro o aminoaromático, a una dosis adecuada, lo que da origen a una desnaturalización oxidativa de la hemoglobina y a la formación de cuerpos de Heinz [34].
- 3) Se ha dado un fármaco como la primaquina o uno de los indicados anteriormente a bajas dosis (insuficiente para afectar los hematíes normales), a individuos deficientes de G-6-PD (o algún otro defecto eritrocitario que provoca un déficit de glutatión reducido), por lo que la hemoglobina, no puede ser protegida de la desnaturalización oxidativa [34, 99].

4.2.7.7. Prueba de Solubilidad para Hemoglobinas.

Fundamento [88, 94]:

La desoxigenación de la HbS (HbS reducida), se asocia a mayor viscosidad de HbS en solución, cuya solubilidad es unas 50 veces menor que la HbA reducida, por lo que a diferencia de Hb A y la mayoría de hemoglobinopatías, en una solución tampón de fosfatos a una elevada concentración de Hb drepanocítica, liberada de los hematíes por acción de un agente reductor (ditionita sódica), la Hb S se vuelve insoluble (gelificación) y forma cristales acuosos (tactoides) que producen una solución turbia. Por ello, esta prueba es prácticamente específica de hemoglobinopatías.

Material:

Tubos de ensaye de 13 x 100 mm.

Gradillas metálicas para tubos de ensaye de 13 x 100 mm.

Pipetas serológicas de 2 ml (2/100).

Pipetas serológicas de 1 ml (1/100).

Gasas.

Material Biológico:

Sangre completa.

Reactivos (Anexo 1):

Sal sódica de EDTA al 5%.

Ditionita sódica ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) (r.a.).

Tampón de fosfatos a pH 7.5.

Método [94]:

En dos tubos de ensaye de 13 x 100 mm rotulados como paciente (P) y control (C), respectivamente, adicionar 2 ml de la solución tampon de fosfatos a pH 7.5 y 20 mg de ditionita sódica (r.a.).

Mezclar y adicionar 0.1 ml de sangre completa o 0.5 ml de hematíes lavados.

Dejar reposar a temperatura ambiente por 10 minutos.

Centrifugar a 3000 rpm por 2 min.

Leer la turbidez que se presente.

Informe de resultados:

- 1) La presencia de un sobrenadante rojo con precipitado blanquecino en el fondo indica solubilidad normal.
- 2) La presencia de un sobrenadante rosado con precipitado hemoglobínico indica solubilidad parcialmente disminuida.
- 3) La presencia de un sobrenadante pálido con precipitado rojo indica insolubilidad total [94].

Interpretación:

- a) Cuando se presenta una solubilidad normal indica que el paciente no presenta ninguna alteración de HbS.
- b) Cuando la solubilidad es parcialmente disminuida indica que el paciente es un portador heterocigoto HbA/HbS.
- c) Cuando se presenta una insolubilidad total, es indicativo de un paciente con hemoglobinopatía S homocigota [94].

V.- RESULTADOS

El desarrollo experimental se llevó a cabo en el Laboratorio de Análisis Clínicos y Patología de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (F.E.S.C.-U.N.A.M. Campo 1).

Las muestras normales empleadas correspondieron a la población estudiantil de la FES-C1 los cuales fueron seleccionados bajo criterios que se muestran en la tabla 5-1, a estos pacientes se les realizó la serie de pruebas básicas con la finalidad de efectuar una valoración analítica inicial para descartar la existencia de anemia y poder ser considerados en el trabajo. Las pruebas básicas fueron las siguientes: Recuento de hemáties; Determinación de la concentración de hemoglobina y hematocrito; Índices de Wintrobe; Valoración y estudio de la extensión sanguínea (serie roja) y Recuento del % de reticulocitos e Índice Reticulocitario.

Una vez realizada la evaluación inicial se procedió a la serie de pruebas específicas para el diagnóstico de Anemias Hemolíticas, las cuales fueron: Haptoglobina Sérica; Determinación en plasma de: Hemoglobina y Metahemalbúmina; Determinación en orina de: Hemoglobina y Hemosiderina; Prueba de Antiglobulinas de Coombs (Directa e Indirecta); Determinación del título de Aglutininas Frías; Hemólisis a la sacarosa; Hemólisis ácida de Ham; Fragilidad Osmótica, Autohemólisis; Detección seriada para Hemoglobina Falciforme; Desnaturalización por álcali; Cuerpos de Heinz; Estabilidad al calor y Solubilidad de hemoglobinas.

Las siguientes pruebas: Supervivencia del hematíe a ^{51}Cr , Determinación de Hemopexina plasmática, Deficiencia de Piruvato Cinasa, Deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y Electroforesis de hemoglobinas no se realizaron experimentalmente en este trabajo por carecer de reactivos y equipo, pero se incluyen teóricamente en el mismo debido a la importancia clínica que tienen para efectuar el diagnóstico de Anemias Hemolíticas.

Tabla 5-1. Características de la población estudiada.

No. de muestras = 35 pacientes.

Sexo = 20 Femeninos.

15 Masculinos.

Edad = Femenino: 20 a 24 años.

Masculino: 20 a 26 años.

Cuadro 5-1. COMPARACION DE LA \bar{X} EXPERIMENTAL EN FUNCION DE LA \bar{X} DE REFERENCIA PARA LAS PRUEBAS BASICAS EN MUESTRAS NORMALES.

H O M B R E S			
PRUEBA	V_{ref}	\bar{X}_{ref}	$\bar{X}_{exp.}$
Recuento de hematies ($10^6/mm^3$)	4.00 - 6.20	5.10	5.40
Hemoglobina (g/100 ml)	14.0 - 18.0	16.0	16.45
Hematocrito (%)	47.00 - 55.00	51.00	50.00
M U J E R E S			
Recuento de Hematies ($10^6/mm^3$)	4.00 - 5.50	4.75	4.72
Hemoglobina (g/100 ml)	12.00 - 16.00	14.00	14.20
Hematocrito (%)	42.00 - 48.00	45.00	43.00

\bar{X} = Media aritmética.

$\bar{X}_{exp.}$ = Media aritmética experimental.

$\bar{X}_{ref.}$ = Media aritmética de referencia.

Cuadro 5-2. COMPARACION DE LA \bar{X} EXPERIMENTAL EN FUNCION DE LA \bar{X} DE REFERENCIA PARA LAS PRUEBAS BASICAS EN 35 MUESTRAS NORMALES.

PRUEBA	V_{ref}	\bar{X}_{ref}	$\bar{X}_{exp.}$
Indices de Wintrobe			
VCM (μ^3)	85.00 - 95.00	90.00	91.88
HCM (pg)	28.00 - 33.00	30.50	30.28
CHCM (%)	32.00 - 36.00	34.00	32.95
Reticulocitos (%)	0.50 - 1.50	1.00	0.77
Indice de reticulocitos	0.20 - 1.00	0.60	0.40

\bar{X} = Media aritmética.

$\bar{X}_{exp.}$ = Media aritmética experimental.

$\bar{X}_{ref.}$ = Media aritmética de referencia.

Cuadro 5-3. COMPARACION DE LA \bar{X} EXPERIMENTAL EN FUNCION DE LA \bar{X} DE REFERENCIA PARA LAS PRUEBAS ESPECIFICAS EN 35 MUESTRAS NORMALES.

PRUEBA	V_{ref}	\bar{X}_{ref}	\bar{X}_{exp}
Haptoglobina Sérica (mg / 100ml)	30.00 - 200.00	100.00	92.64
Hemoglobina del plasma (mg / 100ml)	0.50 - 2.50	1.50	1.60
Hemólisis a la sacarosa (%)	< 2.50	<1.25	1.41
Hemólisis ácida de Ham (%)	< 10.00	<5.00	4.49
Fragilidad osmótica:			
0 horas (% NaCl)	0.40 - 0.445	0.42	0.42
24 horas (% NaCl)	0.465 - 0.59	0.53	0.49
Autohemólisis:			
Glucosa (%)	< 0.60	<0.30	0.32
SSF (%)	< 3.50	<1.75	1.87
Desnaturalización por álcali	< 2.00	<1.00	0.97

\bar{X} = Media aritmética.

\bar{X}_{exp} . = Media aritmética experimental.

\bar{X}_{ref} . = Media aritmética de referencia.

CUADRO 5-4. RESULTADOS ESTADISTICOS (\bar{X} , S, y C.V.) DE LAS PRUEBAS BASICAS EN MUESTRAS NORMALES.

H O M B R E S			
PRUEBA	\bar{X} .exp.	S	C.V.
Recuento de hematíes	$5.40 \times 10^6/\text{mm}^3$	0.29	5.38 %
Hemoglobina	16.45 g/100ml	0.79	4.85 %
Hematocrito	50.00 %	2.39	4.78 %
M U J E R E S			
Recuento de hematíes	$4.72 \times 10^6/\text{mm}^3$	0.25	5.37 %
Hemoglobina	14.20 g/100ml	0.53	3.74 %
Hematocrito	43.00 %	1.45	3.37 %

$\bar{X}_{\text{exp.}}$ = Media aritmética experimental.

S = Desviación estándar.

C.V. = Coeficiente de variación.

CUADRO 5-5. RESULTADOS ESTADISTICOS (I.C., Ee., PRUEBAS DE HIPOTESIS) DE LAS PRUEBAS BASICAS EN MUESTRAS NORMALES.

H O M B R E S			
PRUEBA	I.C. (95%) "t"	ERROR DE ESTIMACION	PBA. DE HIPOTESIS (95%)
Recuento de hematíes	$5.23 \leq \mu \leq 5.55$ ($10^6/\text{mm}^3$)	± 0.16	$H_0: \mu \leq 5.40$
Hemoglobina	$16.01 \leq \mu \leq 16.89$ (g/100ml)	± 0.44	$H_0: \mu \leq 16.45$
Hematocrito	$48.68 \leq \mu \leq 51.32$ (%)	± 1.32	$H_0: \mu = 50.00$

I.C. = Intervalo de confianza.

CUADRO 5-6. RESULTADOS ESTADISTICOS (I.C., Ee., PRUEBAS DE HIPOTESIS) DE LAS PRUEBAS BASICAS EN MUESTRAS NORMALES.

MUJERES			
PRUEBA	I.C. (95%) "t"	ERROR DE ESTIMACION (95%)	PBA. DE HIPOTESIS (95%)
Recuento de hematíes	$4.60 \leq \mu \leq 4.84$ ($10^6/\text{mm}^3$)	± 0.12	$H_0: \mu = 4.72$
Hemoglobina	$13.94 \leq \mu \leq 14.44$ (g/100ml)	± 0.25	$H_0: \mu = 14.20$
Hematocrito	$42.39 \leq \mu \leq 43.68$ (%)	± 0.68	$H_0: \mu = 43.00$

I.C. = Intervalo de confianza.

CUADRO 5-7. RESULTADOS ESTADISTICOS (\bar{X} , S, y C.V.) DE LAS PRUEBAS BASICAS EN 35 MUESTRAS NORMALES:

PRUEBA	\bar{X} exp.	S	C.V.
Indices de Wintrobe			
VCM	91.88 (μ^3)	3.30	3.60 (%)
HCM	30.28 (pg)	1.11	3.66 (%)
CHCM	32.95 (%)	0.54	1.64 (%)
Reticulocitos	0.77 (%)	0.25	32.13 (%)
Indice de reticulocitos	0.40	0.19	47.52 (%)

\bar{X}_{exp} . = Media aritmética experimental.

S = Desviación estándar.

C.V. = Coeficiente de variación.

CUADRO 5-8. RESULTADOS ESTADISTICOS (I.C., Ee., PRUEBAS DE HIPOTESIS) DE LAS PRUEBAS BASICAS EN MUESTRAS NORMALES.

PRUEBA	I.C. (95%) "t"	ERROR DE ESTIMACION (95%)	PBA. DE HIPOTESIS (95%)
Indices de Wintrobe:			
VCM	$90.79 \leq \mu \leq 92.98$ (μ^3)	± 1.09	$H_0: \mu \leq 91.88$
HCM	$29.91 \leq \mu \leq 30.65$ (pg)	± 0.37	$H_0: \mu = 30.28$
CHCM	$32.77 \leq \mu \leq 33.13$ (%)	± 0.18	$H_0: \mu \geq 32.95$
Reticulocitos.	$0.68 \leq \mu \leq 0.85$	± 0.08	$H_0: \mu \geq 0.77$
Indice de Reticulocitos.	$0.34 \leq \mu \leq 0.46$	± 0.06	$H_0: \mu \geq 0.40$

I.C. = Intervalo de confianza.

CUADRO 5-9. RESULTADOS ESTADISTICOS (\bar{X} , S, y C.V.) DE LAS PRUEBAS ESPECIFICAS EN 35 MUESTRAS NORMALES.

PRUEBA	\bar{X} exp.	S	C.V.
Haptoglobina Sérica	92.64 mg/100ml	25.35	27.37%
Hemoglobina en plasma	1.60 mg/100ml	0.59	36.52%
Hemólisis a la sacarosa	1.41 %	0.71	50.22%
Hemólisis ácida de Ham:			
Tubo 2	4.94 %	0.61	12.34%
Fragilidad osmótica:			
0 horas	0.42 (% NaCl)	0.01	2.91%
24 horas	0.49 (% NaCl)	0.02	3.60%
Autohemólisis:			
Glucosa	0.32%	0.07	21.58%
SSF	1.87%	0.40	21.54%
Desnaturalización por álcali	0.97%	0.30	31.19%

\bar{X} exp. = Media aritmética experimental.

S = Desviación estándar.

C.V. = Coeficiente de variación.

CUADRO 5-10. RESULTADOS ESTADISTICOS (I.C., Ee., PRUEBAS DE HIPOTESIS) DE LAS PRUEBAS ESPECIFICAS EN 35 MUESTRAS NORMALES.

PRUEBA	I.C. (95%) "t"	ERROR DE ESTIMACION (95%)	PBA. DE HIPOTESIS (95%)
Haptoglobina Sérica	$84.24 \leq \mu \leq 101.04$ (mg/100ml)	± 8.40	$H_0: \mu = 92.64$
Hemoglobina en plasma	$1.41 \leq \mu \leq 1.80$ (mg/100ml)	± 0.21	$H_0: \mu = 1.60$
Hemólisis a la sacarosa	$1.18 \leq \mu \leq 1.65\%$	± 0.23	$H_0: \mu = 1.41$
Hemólisis ácida de Ham:			
Tubo 2	$4.74 \leq \mu \leq 5.14\%$	± 0.20	$H_0: \mu = 4.94$
Fragilidad osmótica:			
0 horas	$0.42 \leq \mu \leq 0.43$ (%NaCl)	± 0.00	$H_0: \mu = 0.42$
24 horas	$0.48 \leq \mu \leq 0.49$ (%NaCl)	± 0.00	$H_0: \mu \geq 0.49$
Autohemólisis:			
Glucosa	$0.30 \leq \mu \leq 0.34\%$	± 0.23	$H_0: \mu = 0.32$
SSF	$1.74 \leq \mu \leq 2.00\%$	± 0.13	$H_0: \mu = 1.87$
Desnaturalización por álcali	$0.87 \leq \mu \leq 1.07\%$	± 0.10	$H_0: \mu = 0.97$

I.C. = Intervalo de confianza.

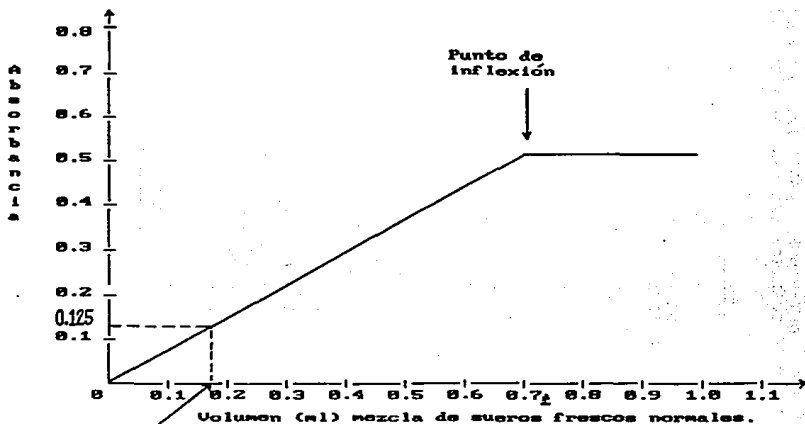
CUADRO 5-11. RESULTADOS OBTENIDOS PARA LAS PRUEBAS ESPECIFICAS CUALITATIVAS EN 35 MUESTRAS NORMALES.

PRUEBA	CRITERIO DE LECTURA OBTENIDO	CRITERIO DE LECTURA DE REFERENCIA
Metahemalbúmina del plasma.	(-)	(-)
Hemoglobina en orina.	(-)	(-)
Hemosiderina en orina.	(-)	(-)
Antiglobulina de Coombs:		
-Directa.	(-)	(-)
-Indirecta.	(-)	(-)
Título de aglutininas frías.	(-)	(-)

(-) Negativo.

Gráfica 3-1

Curva de calibración para la determinación de Haptoglobina Sérica.



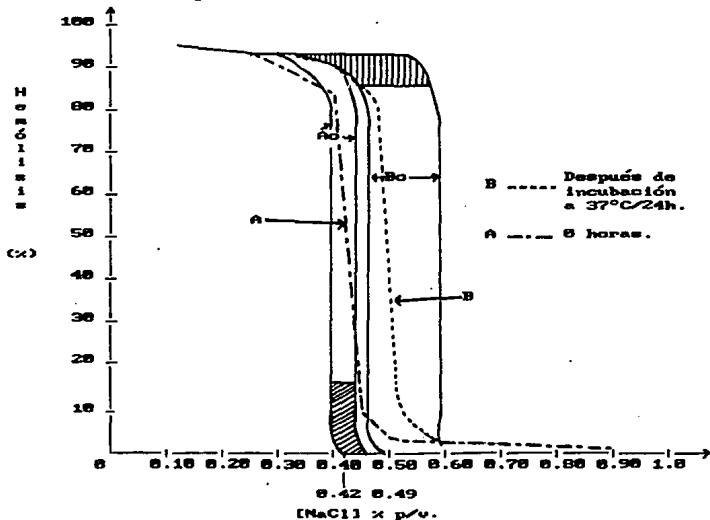
18.52
92.6 mg/dl.



12.5 18.75 25.00 31.25 37.50 43.75 50.00 mg/dl. 1
250 mg/dl.

El punto de inflexión de la curva obtenida, a partir del cual esta se hace plana, indica la cantidad de mezcla de suero no diluida que fija toda la MetaHb presente. La lectura en este punto corresponde a una capacidad de fijación de MetaHb de 50 mg/dl. Debido a que el suero problema se diluye 1:5 las lecturas corresponden a un contenido de Hp de 250 mg/dl. (MetaHb).

Gráfica 3-2

Fragilidad osmótica de los hematíes de 35 muestras normales a las 6 horas y después de incubación a 37°C/24 horas.



-  A0 Fragilidad osmótica de hematíes dada en 50% de hemólisis ($U_{ref} = 0.40$ a 0.45% NaCl).
-  B0 Fragilidad osmótica de hematíes dada en 50% de hemólisis después de incubación a 37°C/24 horas. ($U_{ref} = 0.465$ a 0.59% NaCl).
- A Fragilidad osmótica de hematíes dada en 50% de hemólisis a las 6 horas. $U_{exp} = 0.42\%$ NaCl.
- B Fragilidad osmótica de hematíes dada en 50% de hemólisis después de incubación a 37°C/24 horas. $U_{exp} = 0.49\%$ NaCl.

VI.- DISCUSION

El presente trabajo tiene la finalidad de conjuntar una serie de pruebas básicas y específicas para el diagnóstico y clasificación de las Anemias Hemolíticas. El montaje y la estandarización de estas pruebas están basados en función del material y equipo existente en el laboratorio de Análisis Clínicos y Patología de la Facultad con el propósito de servir como material de apoyo didáctico y experimental.

De acuerdo a los datos experimentales obtenidos se realizó lo siguiente:

La técnica utilizada en el Análisis Estadístico de las pruebas básicas y específicas en las muestras normales fue una Distribución Normal (Prueba "t" student y z), con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$ para obtener los siguientes parámetros estadísticos:

- a) Media aritmética (\bar{X}): Mediante la cual comparamos los valores experimentales con respecto al intervalo de valores de referencia observándose que ésta se encuentra dentro de los intervalos de cada prueba (Cuadros 5-1, 5-2, 5-3).
- b) Desviación estándar (S) y Coeficiente de Variación (C.V.): Medidas de dispersión con las cuales no se observa variación de los valores experimentales con respecto a la \bar{X} (Cuadros 5-4, 5-7 y 5-9).

Lo anterior se complementó con otros parámetros con los cuales se lograron obtener resultados que nos permitieron observar con más detalle si existen diferencias significativas entre los valores experimentales obtenidos en cada prueba con respecto a los de referencia. Estos fueron:

- 1) Construcción de Intervalos de Confianza (I.C.) (Condiciones arriba mencionadas) mediante los cuales se observa que al interpolar los intervalos de confianza experimentales se encuentran dentro del intervalo de valores de referencia (Cuadros 5-5, 5-6, 5-8 y 5-10).
- 2) Error de Estimación (E.e.) el cual nos permite evaluar si existen o no diferencias significativas entre los valores de la media experimental y los de la media de referencia ($\bar{X}_{ref.}$)

en cada método [27, 73, 95]. Los cuadros 5-5, 5-6 y 5-10 nos muestran que no existen tales diferencias entre las medias aritméticas de referencia y experimental.

- 3) Pruebas de Hipótesis: Se realizaron con el propósito de ayudarnos a tomar una decisión con respecto a los métodos empleados, determinando si los valores experimentales obtenidos son similares o no con los datos de referencia de que se dispone [27, 73, 95], por lo tanto apoyándonos en estas pruebas (Cuadros 5-5, 5-6, 5-8 y 5-10) y, en conjunto con los intervalos de confianza y el error de estimación antes descritos, se propone que para los métodos empleados en este trabajo no existen diferencias tales que generen el rechazo experimental de los mismos bajo las condiciones de montaje y estandarización realizadas. Al determinar la distribución de nuestros resultados se encontró que éstos valores de cada una de las pruebas se encuentran en los rangos de Normalidad esperados.

En el cuadro 5-11 se presentan una serie de pruebas en las que el criterio de lectura es Positivo o Negativo, por lo que en éstas no se realizó análisis estadístico; el criterio de lectura normal debe ser negativo.

En la gráfica 5-1 se representa la curva de calibración de Haptoglobina sérica, donde la \bar{x} experimental de las densidades ópticas (D.O.) interpoladas nos da una media de 92.6 mg/100 ml hallándose ésta dentro de intervalo de referencia.

En la gráfica 5-2 se muestran las curvas experimentales correspondientes a la prueba de fragilidad osmótica a las 0 y 24 hrs. (Curvas A y B) respectivamente, en las cuales se graficaron los valores de las medias experimentales correspondientes al % de hemólisis v.s. la concentración de NaCl expresada en % (p/v). Al realizar la interpolación del 50% de hemólisis se obtienen los valores de 0.42 y 0.49 % de NaCl para las curvas de 0 y 24 hrs., los cuales se encuentran dentro del intervalo de los valores de referencia como lo representan las curvas A₀ y B₀ respectivamente.

Las diferencias halladas de los valores obtenidos entre la población estudiada, pueden deberse a la variabilidad biológica, ya que los seres humanos tenemos una diferente respuesta ante las circunstancias que nos acontecen, y que la mayoría de las veces se pretende encajar esta respuesta biológica, dentro de una cierta rigidez que nos conduce a errores, pero pocas veces tenemos conciencia de lo que esto significa, la variabilidad humana es la regla y no la excepción, en muchas situaciones que acostumbramos a considerar como "anormales" no necesariamente puede considerarse como patología porque la variabilidad puede verse afectada por una gran cantidad de factores.

Podemos concluir que una parte fundamental de este estudio radicó también en que es importante el comparar los respectivos avances y limitaciones de los métodos convencionales (básicos y específicos) en el diagnóstico de Anemias Hemolíticas para una mejor interpretación de los resultados.

VII.- CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos se concluye lo siguiente:

- 1) Se logró la elaboración de un manual para el diagnóstico de Anemias Hemolíticas, el cual comprende pruebas de laboratorio con sus fundamentos y metodologías, así como una breve explicación de las mismas en función del trastorno hemolítico, cuya finalidad es servir como apoyo académico y experimental a futuros y actuales profesionistas del Area de la Salud.
- 2) Se llevó a cabo la integración de las pruebas básicas y específicas con la finalidad de reunir información teórica y experimental de los métodos más aplicados en el diagnóstico de Anemias Hemolíticas.
- 3) Se realizó el montaje y estandarización de las pruebas básicas y específicas para diagnóstico de Anemias Hemolíticas en función de la Infraestructura del Laboratorio de Análisis Clínicos y Patología de la Facultad.
- 4) Las bases fundamentales de los mecanismos de hemólisis incluidos en este trabajo nos permitieron conocer la etiología de los trastornos hemolíticos y así comprender los métodos utilizados en el diagnóstico.
- 5) Finalmente podemos concluir que existen pocos centros de Investigación enfocados a la realización de estudios necesarios para detectar las causas de las Anemias Hemolíticas. Por otro lado, tales estudios nos ayudarían a conocer la frecuencia con la que se encuentran estas patologías en nuestro país y reportar estos hallazgos para que otros laboratorios apliquen estas pruebas como complemento al diagnóstico en el área hematológica.

VIII.- ANEXOS

ANEXO 1

PREPARACION DE SOLUCIONES

I.- PRUEBAS BASICAS.

1) RECUENTO DE HEMATIES.

a) Diluyente de Hayem.

- Dicloruro de mercurio	0.5 g.
- Cloruro Sódico	1.0 g.
- Sulfato Sódico	5.0 g.
- H ₂ O destilada c.b.p.	200.0 ml.

2) DETERMINACION DE HEMOGLOBINA.

a) Reactivo de Drabkin

- Cianuro de sodio	100.00 mg.
- Ferricianuro de potasio	300.00 mg.
- H ₂ O destilada c.b.p.	1000.00 ml.

3) VALORACION Y ESTUDIO DE LA EXTENSION SANGUINEA:

a) Colorante de Wriyth

- Colorante de Wriyth	5.0 g.
- Glicerina q.p.	30.0 ml.
- Metanol c.b.p.	1000.0 ml.

Este colorante debe dejarse madurar por lo menos un mes y filtrarse antes de usarse.

b) Solución amortiguadora para colorante de Wriqth

Disolver:

- Fosfato sódico 4.539 g.
- Fosfato monopotásico 5.940 g.
- H₂O destilada c.b.p. 100.0 ml.

De esta solución tomar 9.54 ml y aforar a 1.0 litros con H₂O destilada, esta solución debe quedar a un pH entre 6.4 y 6.5.

4) RECUESTO DE RETICULOCITOS:

a) Colorante azul de cresil brillante

- Azul de cresil brillante 1.0 g.
- Disolver en 100 ml de solución salina citradada (1 parte de citrato sódico al 3.0% más 4 partes de cloruro sódico al 0.9%).

b) Citrato sódico al 3.0%

- Citrato sódico 3.0 g.
- H₂O destilada c.b.p. 100.0 ml.

II.- PRUEBAS ESPECIFICAS.

1) DETERMINACION DE HAPTOGLOBINA EN PLASMA.

a) Reactivo de Guayacol (Connel y Smithies).

- Guayacol q.p. 3.72 g.
- H₂O destilada c.b.p. 700.0 ml.
- Acido acético 1 M 100.0 ml.

Ajustar el pH de la mezcla a 4.0 por adición de hidróxido de sodio 1 M, y verificar con un potenciómetro. Completar con H₂O destilada c.b.p. 1000.0 ml.

b) Peróxido de Hidrógeno (H₂O₂) 0.05 M, se prepara antes de usarse.

- H₂O₂ grado reactivo de 5.66 ml.
100 vol. (30.0%).
- H₂O destilada c.b.p. 1000.0 ml.

c) Solución de Metahemoglobina

- Determinar la concentración de Hb en sangre de un control normal por el método de la Cianometahemoglobina.
- Diluir la sangre hasta alcanzar una concentración de Hb de 1g/100ml.
- A 25 ml de esta solución se le añaden 10 ml de ferricianuro de potasio (100mg/100ml) para convertir la Hb en Metahemoglobina.
- Dejar reposar 10 min. a temperatura ambiente.
- Completar el volumen a 500 ml con H₂O destilada. La solución puede guardarse durante 2 semanas a 0° C.

d) Cloruro Sódico 0.15 M

- Disolver 8.775 g de cloruro de sodio (grado reactivo) en H₂O destilada y aforar a un litro.

2) DETERMINACION DE HEMOGLOBINA EN PLASMA.

a) Reactivo de Bencidina al 1.0% (p/v).

- Bencidina base (no el clorhidrato) 1.0 g.
- Acido acético glacial c.b.p. 100.0 ml.

La solución a de ser clara y casi incolora; se oscurece un poco al cabo del tiempo. El reactivo es estable durante 7 a 10 días si se guarda refrigerado. Antes del uso se calienta a temperatura ambiente.

b) Peróxido de Hidrógeno (H₂O₂) al 3.0%.

c) Estándares de Hemoglobina:

- i) Estándar de depósito: Se obtienen 10 ml de sangre citratada, se separa al plasma por centrifugación a 2500 rpm durante 10 min. Eliminar el plasma y lavar las células residuales 4 veces con SSF al 0.85%. Se lisan las células por adición de un volumen igual de H₂O destilada seguida de vigorosa agitación y se centrifuga a 5000 rpm durante 15 min. Se extrae con pipeta Pasteur el sobrenadante (Soln. acuosa de Hb). Se analiza el contenido de Hb por el método de

cianometahemoglobina y, en base a la concentración de Hb presente se diluye hasta ajustar a una concentración de 10g/100ml. Se guarda la solución en congelación repartida en porciones alícuotas de un ml.

ii) Estándar de depósito diluido:

Un ml de la solución de depósito se diluye 1:100 (1ml = 100mg, será la concentración de esta nueva solución). Este estándar es estable en refrigeración durante 1 mes.

iii) Estándar de trabajo: Se diluye 1 ml de la solución estándar de depósito diluido 1:100. Un volumen de esta solución se diluye con un volumen igual del reactivo de bencidina. Se prepara esta mezcla de modo que sea reciente, es estable durante 3 o 4 hrs. (la concentración de esta última solución deberá ser de 0.5 mg/100ml).

c) Testigo de bencidina.

- Se diluye un volumen del reactivo de bencidina con un volumen de H₂O destilada. Es estable durante una semana.

d) Acido acético glacial al 20.0% (v/v).

- La solución a de usarse recién preparada.

3) DETERMINACION DE HEMOSIDERINA EN ORINA.

(Reacción de Azul de Prusia).

a) Ferricianuro potásico 0.1 g.

i) H₂O destilada c.b.p. 10.0 ml.

Mezclar y añadir:

ii) Acido clorhídrico 0.1 ml.

b) Ferrocianuro potásico al 2.0%

Acido clorhídrico al 1.0%.

4) PARA VERIFICAR LA PRESENCIA DE HEMOGLOBINURIA PAROXISTICA NOCTURNA.

a) Prueba Confirmativa de Hemólisis con Sacarosa.

i) Solución Isotónica Sacarosa: Disolver 92.4 g de sacarosa en 91 ml de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}$ de 50 mM y 9.0 ml de PO_4HNa de 50 mM, y ajustar el pH a 6.0 con ácido clorhídrico o hidróxido de sodio concentrado. Añadir H_2O destilada hasta un volumen de 1000.0 ml. Esta solución debe conservarse a 4°C durante 2 semanas.

ii) Hidróxido amónico 0.04%.

b) Prueba de Hemólisis Acida de Ham.

i) Acido clorhídrico 0.2N.

ii) Hidróxido Amónico 0.04% (v/v)

5) PARA DETERMINAR ESFEROCITOSIS HEREDITARIA.

i) Prueba de Fragilidad Osmótica.

- Solución de NaCl de concentraciones:

1.0, 0.95, 0.90, 0.85, 0.80, 0.75, 0.70, 0.65, 0.60, 0.55, 0.50, 0.45, 0.40, 0.35, 0.30, 0.25, 0.20, 0.15, 0.10% (p/v).

ii) Prueba de Autohemólisis.

a) Solución estéril de glucosa al 10% en NaCl al 0.85%.

b) Solución de NaCl al 0.85% estéril.

c) Reactivo de Drabkin.

6) PARA DETERMINAR DEFICIENCIAS ENZIMATICAS DEI. HEMATIE.

a) Valoración de Piruvato Cinasa (PC).

i) Tampon Tris HCl-EDTA pH 8.0: Disolver 12.1 g de Tris y 168 mg de EDTA disódico en aproximadamente 80 ml de H_2O destilada a temperatura ambiente. La adición de HCl se hace mientras se agita la disolución y el pH se va controlando mediante un pH-metro hasta que

alcance el valor de 8.0. Se lleva el volumen total hasta 100 ml. Esta solución es estable durante 3 meses congelada o a 4°C.

- ii) Solución de MgCl₂ 0.1M: Disolver 2.0 g de MgCl₂.6H₂O en agua destilada hasta alcanzar un volumen de 100 ml, esta solución es estable a temperatura ambiental a menos que se desarrollen mohos.
- iii) Solución de KCl 1 M: Pesar 7.5 g. de KCl y disolverlo en 100 ml de H₂O destilada a menos que se formen mohos.
- iv) ADP 30 mmol/l (0.03M): Pesar 0.30 mmoles de ADP y disolver en 8.0 ml de H₂O destilada. Ajustar el pH alrededor de 7.0 mediante solución de NaOH al 0.5% empleando un pH-metro se completa hasta 10 ml con H₂O (la cantidad exacta usada variará con la hidratación, pureza y la sal usada. Serán necesarios 128 mg de ácido libre anhidro).
- v) Solución NADH 2 mmol/l (2mM): Se pesa la cantidad suficiente de NADH para hacer una solución de 2 mg/ml de H₂O destilada aproximadamente. Colocar 0.85 ml de H₂O destilada en una celda de espectrofotómetro de 1 ml con 1 cm de paso para luz. Añadir 0.1 ml de Tampon 1 M Tris HCl-EDTA, pH 8.0. Leer la D.O. a 340 nm (lectura R₁), añadir 0.050 ml de NADH y tomar una segunda lectura (R₂). El volumen de la solución de NADH restante (V₁) debe ser ajustado mediante la adición de H₂O destilada hasta alcanzar el volumen (V₂) según la sig. ecuación:

$$V_2 = \frac{R_2 - R_1}{0.622} \times V_1$$

Esta solución debe prepararse diariamente pero es estable por lo menos durante 8 horas a 4°C.

b) Valoración de Glucosa-6-Fosfato deshidrogenasa.

- i) Acetilfenilhidrazina: 100 mg de acetilfenilhidrazina se disuelven en 100 ml de fosfato amortiguador 0.066 M a un pH de 7.6. A esto se añaden 200 mg de glucosa. Esta solución deberá prepararse antes de

dos soluciones siguientes ambas de concentración 0.15 M:

Soln. A: $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	23.4 g.
H ₂ O destilada c.b.p.	1000 ml.
Soln B: PO_4HNa	21.3 g.
H ₂ O destilada c.b.p.	1000 ml.

Se mezclan 18 ml de la soln. A y 82 ml de la soln. B, ajustar a pH 7.4.

ii) Reactivo de Drabkin.

e) Pruebas de solubilidad para hemoglobinas

i) Tampon de fosfatos a pH 7.5: En un vaso de precipitado de 100 ml se disuelven 30 g de sulfato amónico en 90 ml de agua destilada. Se añaden 1.2 g de fosfato dipotásico, calentando moderadamente para disolver a continuación 1 g de saponina. Debe agitarse lentamente la mezcla, ya que la saponina en solución forma espuma con rapidez. La agitación debe mantenerse hasta que la disolución sea completa. Ajustar el volumen a 100 ml y el pH a 7.5 con solución de hidróxido de potasio 1 N.

El buffer así preparado es estable en frasco oscuro durante 1 mes en refrigeración.

ANEXO 2

PARAMETROS EMPLEADOS EN EL ANALISIS ESTADISTICO.

A) Media Aritmética (\bar{X}).

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n}$$

donde: n = # de valores

$$\sum_{i=1}^n X_i = \text{Sumatoria de los valores de la variable.}$$

B) Desviación Estándar (S).

$$S = \sqrt{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}$$

C) Coeficiente de Variación (C.V.).

$$C.V. = \frac{S}{\bar{X}}$$

D) Intervalo de Confianza (I.C.) para la distribución "t" student.

$$I.C. = \bar{X} \pm t_{(1-\alpha/2)} \frac{S}{n}$$

donde: $\frac{S}{n}$ = error estándar.

$t_{(1-\alpha/2)}$ = Coeficiente de Confiabilidad
(Valor de tablas)

e) Intervalos de Confianza de distribución Normal "z"

$$\bar{X} \pm z_{(1-\alpha/2)} \frac{S}{n}$$

donde : $z_{(1-\alpha/2)}$ = Coeficiente de Confiabilidad
(Valor de tablas)

F) Prueba de Hipótesis (al 95%, $\alpha = 0.05$).

1) $H_0 : \mu = \bar{X}$

donde:

$H_1 : \mu \neq \bar{X}$

H_0 : Hipótesis nula.

H_1 : Hipótesis alterna.

Si $H_1 : \mu \neq \bar{X}$

Entonces: $H_0 : \mu \geq \bar{X}$

$H_1 : \mu \leq \bar{X}$

2) Distribución t.

$$t = \frac{\bar{X} - \mu}{S / \sqrt{n}}$$

donde:

μ = Media poblacional (\bar{X} de los valores de referencia)

\bar{X} = Media de la muestra.

S/\sqrt{n} = Error Estándar.

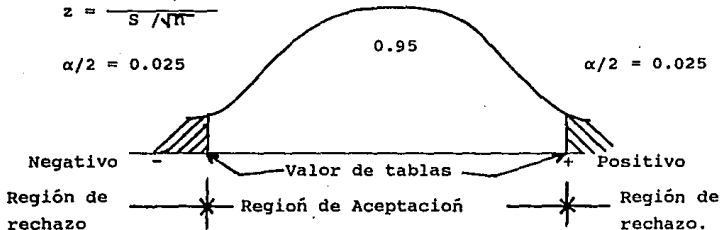
3) Distribución z.

$$z = \frac{\bar{X} - \mu}{S / \sqrt{n}}$$

$\alpha/2 = 0.025$

0.95

$\alpha/2 = 0.025$



IX.- REFERENCIAS

- 1.- Advani, R.S.; Sorenson, S.; Shinar, E.; Lande, W.; Rochmlewitz, E. and Schriener, S.L. (1992): *Characterization and Comparison of the Red Blood Cell Membrane Damage in Severe Human a-b Thalassemia*. *Blood* 79(4):1058-1063.
- 2.- American Association of Blood Banks. *Technical Manual* 10th. edition United States of America (1990): 592-593.
- 3.- Baez Villaseñor, J. *Hematología Clínica*. 3^a ed.; Ed. Librería de Medicina; Méx. 1970, p.113-137.
- 4.- Balcells, G.A. *La Clínica y el Laboratorio*. 14^{ava} ed. Ed. Marín, México. 1986. p. 154-597.
- 5.- Bailey, K; Morris, J.S.; Thomas, P.; Serjeant, G.R. (1992): *Fetal Hemoglobin and early manifestations of homozygous sickle cell disease*. *Arch. Dis. Child.* 67(4):517-520.
- 6.- Barnett R.N., *Estadística en el Laboratorio Clínico*. Ed. Reverté, España, 1983 : 35-39, 74-76.
- 7.- Basset, P.; Beuzard, Y; Garel, M.C. and Rosa, J. (1978) *Isoelectric Focusing of Human Hemoglobin: It's Application to Screening to the characterization of 70 variants, and to the study of Modified fractions of normal Hemoglobins*. *Blood.* 51(5) (May):971-972.
- 8.- Barket, R.N.; Casswell, K.M.; Reid, M.E.; Sokol, R.J. and Elson, C.J. (1992): *Identification of autoantigens in autoimmune haemolytic anaemia by a non-radioisotope immunoprecipitation method*. *Br. J. Haematol.* 82:126-132.
- 9.- Bartholomew, J.R.; Bell, W.R.; Shirrey, R.S. (1987): *Cold Agglutinin Hemolytic Anemia. Management with and Enviromental suit*. *Ann. Inter. Med.* 106:243-244.

- 10.- Bernard, J.; Levy, J.P. *Manual de Hematología*. 3^a ed. Ed. Toray-Masson, S.A. España 1982. p.25-26, 90-116.
- 11.- Beutler, E.M.D. (1991): *Glucose 6-Phosphate dehydrogenase deficiency*. *N. Eng. J. Med.*, 324:169-174.
- 12.- Beutler, E.; In Stanbury, J.B.; Wyngaarden, J.B., Fredrickson, S.D.; Goldstein, J.L. and Brown, M.S. (eds): *Glucose 6-Phosphate dehydrogenase deficiency. The Metabolic Basis of Inherited Disease*. 5th. ed. New York, Mc Graw-Hill (1983):
- 13.- Blume, K.G.; Hoff Bayer, R.W.; Busch, D.A. and Lühr, G.N. (1971): *Purification and properties of pyruvate kinase in normal and in pyruvate kinase deficient human red blood cells*. *Biochem. Biophys. Acta.* (227):364.
- 14.- Borrego, P.; Tome, M.; Cascales, P.; García, J.M.; Pérez, A.G.; Abad, A. (1991): *Hemólisis Intravascular masiva en septicemia por Clostridium perfringens*. *Sangre*. 36(4):315-327.
- 15.- Brito Barroso, M.L.; Machado, M.P. (1993): *Anemias Hemolíticas Autoinmunes*. *Medicine* 6(11):485-491.
- 16.- Carpenter, L.P. *Inmunología y Serología*. 2^a ed. Ed. La Prensa Médica Mexicana 1982 p.302.
- 17.- Catwright. *Diagnostic Laboratory Hematology*. (1972): 289.
- 18.- Císcar, R.F. *Diagnóstico Hematológico*. 3^a ed. Ed. JIMS. Barcelona. 1972 p.74, 608-616, 1219-1332, 1381.

- 19.- Conboy, J.G.; Shitamoto, R.; Parra, M.; Winardi, R.; Kabra, A.; Smith, J. and Mohandas, N. (1991): *Hereditary Elliptocytosis Due to Both cualitative and cuantitative Defects in membrane skeletal Protein. 4.1. Blood* 78(9):2438-2443.
- 20.- Conboy, J.G. (1993): *Structure, function and Molecular Genetics of Erythroid Membrane Skeletal Protein-4.1 in normal and abnormal Red Blood Cells Seminars in Hematology.* 50(1):58-73.
- 21.- Cushing, John E. *Pincipios de Inmunología* Ed. Acribia España 1960: 21.
- 22.- Chávez, F.G.; Mulinares J.; Edmons, D.L. (1991): *Epidemiology of Rh Hemolytic Disease of the Newborn in the United States.* JAMA, (June) 265(24):3270-3274.
- 23.- Charambach, A.; Dunn, M.J.; Radola, J. *Advances in Electrophoresis* Vol. I VCM Publishers. Federal Republic of Germany 1987: 385-394.
- 24.- Dacie, J.S. *Paroxysmal Nocturnal Haemoglobinuria.*
- 25.- Dhananjaya, K.; Kaul, Haos (1991): *Rate of Deoxygenation and Rheologic Behavior of Blood in Sickle Cell Anemia. Blood* 77(6) March 15:1353-1361.
- 26.- Englefriet, C.P.; Overbeeke and Von dem Borne, K. (1992): *Autoimmune Hemolytic Anemia. Seminars in Hematology* 29(11):3-12.
- 27.- Flores, B. Fernando. *Probabilidad y Estadística.* FES-Cuautitlán, UNAM, México 1991. p.6-19.

- 28.- Fujii, M. Miwa. S, (1990): *Recent Progress in the Molecular Genetic Analisis of Erythroenzymopathy*. Am. J. of Hematol. 54:301-310.
- 29.- Giulian, G.G.; Moss, R.L. and Greaser, M. (1984): *Analytical Isoelectric focusing using a high-voltage vertical slab polyavrylamide gel system*. Anal. Biochem. 142:421-436.
- 30.- Gordon, B.L. *Lo esencial de la Inmunologia* 2ª ed. Ed. El Manual Moderno . México 1975. p.62-63.
- 31.- Hanspal, M.; Yoon, S.H.; Yu M.; Hanspal, J.; Lambert, S.; Pale, K.J, and Pichal, J.T. (1991): *Molecular basis of Spectrin and Ankyrin Deficiencies in severe Hereditary Spherocytosis; Evidence Implicating a Primary Defect of Ankyrin*. Blood 77(1) January 165-173.
- 32.- Hardisty, R.M. *Blood and its disorders*. Blackwell Scientific publications. United States of America 1974: 109, 320.
- 33.- Hartmann, R.C.; Jenkis, D.E. and Arnold, A.B. (1970): *Diagnostic Specificity of Sucrose Hemolysis Test for Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria*. Blood 35(4):462-475.
- 34.- Henry, J.B. *Diagnóstico y Tratamiento Clínicos por el Laboratorio*. 8ª ed. Ed. Salvat España 1988 39, 43, 134-135, 143, 182-183, 204-211, 220-227, 380.
- 35.- Hernández García M.T., Hernández Nieto L.(1993): *Síndrome Anémico y Clasificación de las Anemias*. Medicine. 6(11):424-428.
- 36.- Hernández García M.T. (1993): *Anemia Ferropénica* Medicine 6(11):429-437.

- 37.- Hess, D.C., et al. (1991): Sickle Cell anemia and other hemoglobinopathies. Semin. Neurol. 11(4):Dec 314-28
- 38.- Hillman, R.S. Manual de Hematología Ed. El Manual Moderno México. 1977. p. 65, 83, 92, 110.
- 39.- Moefer Scientific Instruments. Technical Manual United States of America (1992-1993). p. 122-135.
- 40.- Itano, H.A. (1983) Arch. Biochem. Biophys. 47:148.
- 41.- James, S. Thompson Genética Médica 2^a ed. Ed. Salvat Editores S.A. España 1975 p.214.
- 42.- James, W.D.; Piergorio, R. and Bunn, H.F. (1971): The separation of human and animal hemoglobins by isoelectric focusing in Polyacrilamde gel. Biochem. A. Biophysics Acta, 299:42-50.
- 43.- Jeppsson, J.O. and Berglung, S. (1972): Thin-layer isoelectric focusing for haemoglobin screening and its application to haemoglobin Malmo. Clin. Chim. Acta. 40:153-158.
- 44.- Kanno, M.; Fujii, M.; Hirano, A.; Omine, M.; Miwa, S. (1992): Identical Point-Mutations of the R-type Piruvate Kinase (PK) cDNA found in unrelated PK variants Associated with Hereditary Hemolytic Anemia. Blood 79(5)March:1347-1350.
- 45.- Kazazian M., M. Jr. (1990): The Talassemia Syndromes: Molecular Basis and Prenatal Diagnosis in 1990 Seminars in Hematology 27(3):209-228.
- 46.- Kolmer, J.A. Diagnóstico Clínico por los Análisis de Laboratorio 3^a ed. Ed. Interamericana México, 1983 :1-17.

- 47.- Lawrence, W. Powers. *Diagnostic Hematology Clinical and Technical Principles*. The C.V. Mosby Company United States of America (1989). p. 50, 192, 201, 204, 269.
- 48.- Lehninger, A.L. *Biochemistry* Second edition. Worth. Publishers, Inc. New York, 1978. p. 273.
- 49.- Lichtman, A.M. *Hematología Clínica* 2^a ed. Ed. Interamericana, México 1990 p. 50-81.
- 50.- Linman, W. James. *Hematology, Physiologic, Pathophysiologic and Clinical Principles*. Ed. Mac. Millan. Publishing. Co. Inc., United States of America, 1975: p. 18, 114-118.
- 51.- Loukopoulos, D.; Madji, A.; Papadakis, M.; Karahaba Ph,, Sinopoulouk,; Mesoghiis, S.; Loutradi, A.; Fessas Ph. (1990): *Prenatal Diagnosis of Thalassemia and of the sickle cell syndromes in Greece*. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 612:226-236.
- 52.- Mansouri, A; Laurie A.A. *Concise* (1993): *Methemoglobinemia*. *Am. J. of Hematol.* 42:7-12.
- 53.- *Manual del IMSS. Laboratorio Clínico: Procedimientos. Subdirección General Médica. México.*
- 54.- Marchand, A.; Galen, R.S.; Lente, F.V. (1980): *The Predictive value of Serum Haptoglobin in Hemolytic Disease*. *JAMA*, May. 243(19):1909-1911.
- 55.- Markus, M.; Forver J.C. (1986): *Splenic mediation in treating vor autoimmune hemolytic anemia*. *Br. Med. J.* 293:839-840.
- 56.- Matthew, J. Lynch. *Métodos de Laboratorio* 2^a ed. Ed. Interamericana México 1985. p. 188, 470, 471, 474, 475, 480-481, 754-759, 850, 906-907, 1266.

- 57.- Meireles, J.R.; Ruiz A, et all. (1990): *Theoretical isoelectric points and electric charges of mutated human hemoglobin subunits.* Clin. Chim. Acta. 190:189-198.
- 58.- Mernaugh, G. et al. (1992): *Deformation factor: an extracellular protein synthesized by Bartonella-bacilli-formis that deforms erythrocyte membranes.* Infect. Immun. Marz. 60(3):937-43.
- 59.- Merry, A.M.; Rawlinson, I.V.; Uchikawa, M.; Daha, M.R.; S.R.B. (1989): *Studies on the sensitivity to complement-mediated lysis of erythrocytes (Inab. phenotype) with a deficiency of DAF (decay accelerating factor).* Br. J. Haematol. 73:248-253.
- 60.- Mohandas, N. Chasis, J.A. Shoet, S.B. (1993): *The Influence of Membrane Skeleton on Red Cell Deformability, Membrane Material properties and shape.* Seminars in Hematology. 20(30):225-242.
- 61.- Mohanadas, N.; Clark, M.R; Health, B.P.; Rossi, M.; Wolf, L.C.; Shoet, S.B. (1982): *A technique to Detect Reduced Mechanical Stability of Red Cell Membranes: Relevance to Ellyptocytic disorders.* Blood 59(4) April:768-773.
- 62.- Molden, D.P.; Nicholas, M. Alexander, et al. (1982): *Fetal Hemoglobin-Optimum conditions for its Estimation by alkaly Denaturation.* Am. Soc. of Clin. Pathol. (A.J.C.P.). May:568-572.
- 63.- Nagel, R.L. (1991): *Severity, Pathobiology, Epistatic Effects and Genetic Markers in Sickle Cell Anemia.* Seminars in Hematology 28(3):180-201.

- 64.- Ninomiya, H.; Hbe, T. Schichishima, T.; Teresawa, T; Fujita, T. (1988): Decay-accelerating factor (DAF) on the blood cell membranes in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH): measurement by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Br. J. Haematol.* 69:81-87.
- 65.- Palek, J. Lamberts (1990): Genetics of the Red Cell membrane Skeleton. *Seminars in Hematology* 27:290-332.
- 66.- Palek, J. and Lux, E. S. (1983): Red Cell membrane Skeletal Defects in Hereditary and Acquirid Hemolytic Anemias. *Seminars in Haematology* 20(3) Jul:189-224.
- 67.- Papandreou, P.T. and Rakitzis, E. M. (1988): Inhibition by a free-radical scavenger of ascorbate-induced hemoglobin denaturation glucose 6 phosphate dehydrogenase deficient erthrocytes. *Clin. Chim. Acta.* 189:253-254.
- 68.- Paroxysmal Nocturnal Haemoglobinuria (1992). *The Lancet* Feb. 15; 339: 395-396.
- 69.- Pittiglio, D.H. *Clinical Hematology and Fundamentals of Hemostasis*. Ed. F. A. Davis Company. United States of America, 1987. p. 61-181.
- 70.- Rakitzis, E.T.; Papandreou, P.T. (1990): Spectrophotometric evaluation of results of the ascorbate and the ascorbate cyanide screening test for glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Clin. Chim. Acta.* 187:189-198.
- 71.- Rakitzis, E. T. and Papandreou, P. T. (1988): Ascorbate-induced generation of free radical species in normal and glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient erithrocytes. *Biochem. Soc. Trans.* 17:371-372.

- 72.- Rapaport, I. Samuel. *Introducción a la Hematología*. 2^a ed. Ed. Salvat Editores, S.A. México 1989. p. 81-164.
- 73.- Remington R.D. *Estadística Biométrica y Sanitaria* Ed. Prentice Hall Internacional. España 1974. p. 22-31, 134-172, 173-207.
- 74.- Rey, K.S.; Unger, C.A.; Rao, S.P.; Miller, S.T. (1991): *Sickle cell hemoglobin E disease: Clinical Findings and Implications*. *J. of Pediatrics*. 119(6):949-995.
- 75.- Righetti. P. and Drysdale, J. W. (1971): *Isoelectric focusing in polyacrylamide gels*. *Biochem. Biophys. Acta*. 226:17-28.
- 76.- Rose, R. Noel; Friedman German. *EL Laboratorio en Inmunología Clínica*. 2^a ed. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires 1984 p. 51-52, 818.
- 77.- Rosinfield, R. E. (1980): *Current treatment of Immune Hemolytic Anaemias*. *Sangre*, 25:883-889.
- 78.- Rosse, W. F. (1990): *Phosphatidyl Inositol-linked Proteins and Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria*. *Blood* 75(8) April 15:1595-1606. (Review article).
- 79.- Rosse, W. F. (1993): *Evolution of Clinical Understanding Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria as a Paradigm*. *Am. J. Haematol* 42:122-126.
- 80.- Rotuli Band, Luzcato, L. (1989): *Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria*. *Seminars in Hematology* 26(3):202-207.
- 81.- Salama, A. and Mueller, Eckardt, C. (1987): *Autoimmune haemolytic anaemia in Childhood associated with non-complement binding IgM autoantibodies*. *Br. J. Haematol*. 65: 67-71.

- 82.- Serrano, J. (1992): *Anemia Hemolítica Autoinmune (Revisión de 200 casos en un periodo de 20 años (1970-1989))*. Sangre 37(4):265-274.
- 83.- Shinar, E; Rachmilewitz, E. A. (1990): *Oxidative Denaturation of Red Blood Cells in Thalassemia*. Seminars in Hematology 27(1) January :70-82.
- 84.- Sonnenwirt, Alex C. *Métodos y Diagnósticos del Laboratorio Clínico*. Vol. I, 8^aed. Ed. Médica Panamericana. Argentina 1983 p. 444, 470, 777-78, 817-820, 980.
- 85.- Spinnato, J. A. (1991): *Hemolytic disease of the fetus (comment)*. Am. J. Obstet. Gynecol. 165(3) Sep: 546-53.
- 86.- Spinnato, J. A. (1992) *Hemolytic disease of the fetus (letter; comment)*. Am. J. Obstet. Gynecol. 166(5) May:1589-90.
- 87.- Sullivan, M. Keith; Reid, D. C. (1991): *Introduction to a Symposium on sickle cell anemia: Current Results of Comprehensive care and the Evolving Role of bone Marrow Transplantation*. Seminars in Haematology 28(3) July :177-179.
- 88.- Thein, S. L. (1992): *Dominant β -Thalassemia: Molecular Basis and Pathophysiology*. Br. J. Haematol. 80:273-277.
- 89.- Tietz, Norbert. *Química Clínica Moderna*. Ed. Interamericana. México, 1972 p. 275-278.
- 90.- Valadez Nava, S. *Síndromes Gastroenterológicos más frecuentes en México*. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala - UNAM. 1989:25.

- 91.- Vichinsky, E. P. and Lubin, B. M. (1980): *Unstable hemoglobin, Hemoglobins with altered oxygen affinity and H hemoglobin*. *Pediatr. Clin. North. Am.* 27(2):421.
- 92.- Virella, Gabriel. *Introduction to Medical Immunology*. Second edition. Marcel Dekker, Inc., United States of America. 1990. p.272.
- 93.- Vives Curróns, J. L. (1993): *Anemias Hemolíticas por alteraciones de la membrana Eritrocitaria y por eritroenzimopatías*. *Medicine* 6(11):458-469.
- 94.- Vives, Juan Lluís. *Manual de Técnicas de Laboratorio en Hematología*. 2ª reimpresión. Ed. Salvat. España, 1988. p. 281-321.
- 95.- Wayne, Daniel. *Bioestadística: Bases para el Análisis de las Ciencias de la Salud*. 6ª reimpresión. Ed. Limusa. Méjico, D. F., 1985 p.8-15, 119-137, 155-189.
- 96.- Whitfield, C. F.; Follweiter, J. B.; Marrow, I.; Miller, B. A. (1991): *Deficiency of a-Spectrin Synthesis in Burst-forming united-Erythroid in lethal Hereditary Spherocytosis*. *Blood* 79(11): Dec.:3043-3051.
- 97.- Whittle, J. Martin. (1992): *Rhesus haemolytic disease*. *Arch. Dis. Child.* 67:65-68.
- 98.- Wilcox, L. A.; Ezzell, J. L.; Bernshaw, N. J. and Parker, C. J. (1991): *Molecular Basis of the Enhanced Susceptibility of the Erythrocytes of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria to Hemolysis in Acidified Serum*. *Blood* 78(3):820-829.
- 99.- Williams, J. W. *Hematología* 2ª ed. Ed. Salvat, España, 1990. p. 73, 180, 181, 197, 390, 468-482, 508, 1392, 1411-16, 1428, 1709-10, 1716-1720.

- 100.- Winterburn, C. C. (1990): *Oxidative Denaturation in Congenital Hemolytic Anemias: The Unstable Hemoglobins.* *Seminars in Hematology.* 27(1) January:41-50.
- 101.- Wintrobe, Maxwell, M. *Clinical Hematology.* Eight edition. Lea & Febiger, United States of America, 1981. p. 395, 904, 978-990.
- 102.- Woodliff, H. J.; Hermann, R. P. *Hematología Clínica* Ed. El Manual Moderno, México, 1987. p. 35-36, 45, 59, 85.
- 103.- Zerez, C. R.; Lechant, N. A.; Tanaka, K. R. (1990): *Impaired Erythrocyte Methemoglobin Reduction in sickle Cell Disease: Dependence of Methemoglobin Reduction in Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide content.* *Blood.* 76(5)Sep.: 1008-1014.