

Zjic



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES ZARAGOZA

Correlación del Índice Fagocítico con
el Grado de Hipertensión Portal e
Hiperesplenismo en Pacientes con
Cirrosis Hepática

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
P R E S E N T A:
ESPERANZA ARANDA LOERA



MEXICO, D. F.

1987



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CONTENIDO.

CAPITULO	PAGINAS.
I INTRODUCCION	2
II GENERALIDADES	4
2.1 Características del hígado	4-5
2.2 Cirrosis hepática	6
2.3 Hipertensión portal	6-8
2.4 Ascitis	8
2.4.1 Definición	8
2.4.2 Patogenia	8
2.4.2.1 Formación de linfa esplácnica	8-9
2.4.2.2 Formación de linfa hepática	9
2.4.2.3 Manifestaciones clínicas	10
2.5 Defensas del organismo contra la infección	10-11
2.5.1 Células fagocíticas	11-12
2.5.2 Fagocitosis	12-13
2.6 Factores que contribuyen a incrementar la susceptibilidad a la infección en - los pacientes cirróticos	13-15
2.7 Peritonitis bacteriana espontánea en pacientes con cirrosis hepática	15-16
2.8 Hipergammaglobulinemia en la cirrosis hepática	16-17
2.9 Gammagrafía hepática	17
2.9.1 Definición	17
2.9.2 Aplicaciones	17
III DISEÑO EXPERIMENTAL	19
3.1 Objetivos	19
3.2 Hipótesis	19

3.3	Material y métodos	20
3.3.1	Material de laboratorio	20
3.3.2	Equipo	21
3.3.3	Reactivos	21-22
3.4	Consideraciones previas a la toma de la muestra	22
3.5	Desarrollo del trabajo	23
IV	RESULTADOS	25-37
V	ANALISIS DE RESULTADOS	39-42
VI	CONCLUSIONES	44-45
VII	ANEXOS	47-62
VIII	BIBLIOGRAFIA	64-66

C A P I T U L O I

INTRODUCCION

La cirrosis alcohólica es la forma más común de enfermedad hepática en el mundo occidental, y una causa importante de muerte; la frecuencia máxima ocurre en pacientes de 40 a - 55 años, sin embargo, también puede presentarse en los que es tán en el tercer decenio de vida. La proporción entre hombres y mujeres es de 2:1.

La cirrosis es una alteración irreversible de la arqui tectura hepática, que consiste en fibrosis y zonas de regeneración nodular.

Esta enfermedad conduce a que los pacientes presenten grandes alteraciones, entre las que se encuentra un incremento de la susceptibilidad a infecciones bacterianas, por lo -- que en éste trabajo se determinará el índice fagocítico de - los polimorfonucleares neutrófilos "in vitro".

También se observan alteraciones en las pruebas de fun cionamiento hepático, así como en los parámetros de biometría hemática.

Considerando que el hígado es un órgano que cumple con gran cantidad de funciones en el organismo, es de vital impor tancia su adecuado funcionamiento, el cual se altera notablemente con la enfermedad hepática más común, la cirrosis.

C A P I T U L O I I

GENERALIDADES

2.1. CARACTERISTICAS DEL HIGADO.

El hígado es el órgano de mayor tamaño del organismo y su peso en el individuo adulto es de 1500 g. Ocupa una posición fisiológica fundamental, pues se halla interpuesto entre la corriente sanguínea y el resto del organismo. Tiene doble aporte sanguíneo, por un lado la vena porta que proporciona 80% del suministro y por otro lado, la arteria hepática que proporciona aproximadamente 20% (1,2).

La unidad estructural del hígado es el lobulillo hepático, concepto introducido por Kiernan (1833). Cada lobulillo tiene aspecto piriforme, en cuyo centro se dispone la vena central, tributaria de las venas suprahepáticas, y en su periferia los espacios porta que contienen las ramas portal y arterial así como el conducto biliar. Entre ambos sistemas vasculares se extienden las columnas o trabéculas de células hepáticas y los sinusoides intercelulares.

La masa hepática total está formada por el conjunto de estas unidades estructurales. Los estudios de Rappaport (1958) sustituyen el anterior concepto de lobulillo hepático como unidad estructural por el de acino, que es en realidad una unidad estructural y funcional. Cada acino está centrado por un espacio porta, con una rama portal y arterial, que aportan sangre a los sinusoides de distintos lobulillos, con las venas centrolobulillares dispuestas en la periferia.

Las células hepáticas o hepatocitos tienen forma po----

liédrica, de unas 30 micras de diámetro. Su núcleo es central y único con uno o más nucleólos. El citoplasma tiene aspecto-granular conteniendo gran cantidad de glucógeno; se disponen en cordones unicelulares, llamados trabéculas, entre los espacios porta y las venas centrolobulillares. Se hallan sostenidas por una trama de fibras de reticulina y separadas unas de otras por sinusoides.

Las células de Kupffer pertenecen al sistema de fagocitos mononucleares, éstas bordean los sinusoides hepáticos sin constituir en realidad una pared de los mismos.

Los sinusoides hepáticos constituyen una red vascular-carente de pared endotelial, cuyos límites están constituidos por paredes de células hepáticas. Unen el territorio sanguíneo portal y arterial con el suprahepático, y ponen en contacto con células hepáticas la sangre venosa procedente del intestino y bazo y la sangre arterial de la arteria hepática - (1).

El hígado interviene en la mayoría de los procesos metabólicos del organismo. Recibe todos los productos finales de la absorción de proteínas, carbohidratos y grasas, y los transforma en sustancias más complejas indispensables para el funcionamiento normal de los seres vivos. A su vez juega un papel fundamental en la eliminación de productos tóxicos, hormonas y medicamentos.

Es importante también la función de defensa que realiza el hígado, conservando la integridad del organismo cuando éste sufre infección (1,2).

2.2. CIRROSIS HEPATICA.

La cirrosis hepática es una alteración irreversible de la arquitectura del hígado, que consiste en fibrosis y zonas de regeneración nodular, de evolución crónica y progresiva. - Cuando los nódulos son menores de 3 mm y uniformes, se aplica el término de cirrosis micronodular o unilobulillar. En la -- cirrosis macronodular o multilobulillar los nódulos son mayores de 3 mm, varían en tamaño y afectan más de un solo lobulo. Con frecuencia existen en el mismo hígado las características de la cirrosis micronodular y macronodular (3,4).

La cirrosis puede ser provocada por varias causas: por fármacos, toxinas, obstrucción biliar, infecciones, enfermedada des metabólicas, cardiovasculares, etc. Existe también otro tipo de cirrosis cuyo agente etiológico no es conocido y se denomina cirrosis criptogénica.

Las principales secuelas de la cirrosis son: hipertensión portal y sus complicaciones, várices esofágicas y esplenomegalia; la retención de líquidos en forma de ascitis y coma hepático (2,4).

2.3. HIPERTENSION PORTAL

El sistema venoso porta comienza en los capilares de -- los intestinos y termina en los sinusoides hepáticos. El hígado recibe cerca de 1500 ml. de sangre por minuto, dos tercios de los cuales los suministra la vena porta. El hígado ofrece poca resistencia al flujo de sangre, y la presión en los sinusoides es baja. La presión portal normal es de 7 mm de Hg o -

de 10 a 15 cm. de agua. La hipertensión portal representa un aumento en la presión hidrostática en la vena porta o sus ramas.

Esto se manifiesta en la clínica por la aparición de -- conductos colaterales portosistémicos, esplenomegalia, ascitis o todo lo anterior. Puesto que la hipertensión porta puede existir sin que haya datos clínicos, se puede descubrir só lo por medición de presiones en el sistema portá. Las de l 3- sinusoides hepáticos se miden por cateterización de venas hepáticas (presión en cuña de vena hepática). Como otra posibilidad, la presión en vena porta puede medirse directamente -- por cateterización transhepática o al momento de alguna inter vención quirúrgica.

La hipertensión porta existe cuando la presión en cuña- de vena hepática es más de 5 mm de Hg mayor que la de vena ca va inferior o cuando la presión de vena porta que se registra al momento de la cirugía rebasa los 10 a 22 mm de Hg (25 a 35 cm. de agua) (4,5).

En general se considera que la hipertensión porta es un trastorno progresivo. Sin embargo, disminuye a medida que la enfermedad hepática mejora (4).

Como manifestaciones clínicas se puede presentar vári-- ces esofágicas o esplenomegalia (aumento del tamaño del bazo) También puede presentarse hiperesplenismo, que consiste en -- una función excesiva del bazo , caracterizada por anemia, leu copenia y principalmente trombocitopenia (4).

Es importante mencionar que el bazo es un componente --

del sistema linfoide periférico, produce células plasmáticas e interviene en los fenómenos inmunológicos específicos; asimismo, se encarga de eliminar los glóbulos viejos o gastados del sistema circulatorio (función homeostática) (6).

También en el bazo se produce un tetrapéptido estimulante de la fagocitosis llevada a cabo por polimorfonucleares -- neutrófilos.

Se ha observado que la extirpación del bazo conduce a graves infecciones bacterianas (7).

2.4. ASCITIS

2.4.1. Definición

La ascitis es el exceso de líquido en la cavidad abdominal, generalmente se presenta como manifestación de hipertensión portal e insuficiencia hepática y más difícilmente secundaria a hipertensión portal por sí sola (5).

2.4.2. Patogenia.

Se forma ascitis en pacientes con hipertensión porta a causa de cambios en la formación y resorción de linfa hepática y esplácica.

2.4.2.1. Formación de linfa esplácica.

Los aumentos de la presión venosa porta causan incremento de la presión en los capilares esplácicos, lo que produce pérdida de líquido hacia el espacio intersticial. Los capilares del intestino limitan la pérdida de proteínas al espacio intersticial, y aparece un gradiante oncótico entre el capilar y el espacio extravas

cular. Este gradiente oncótico hace regresar la mayor parte del líquido hacia el capilar, y toda pérdida suelen extraerla los linfáticos intestinales. Por éste motivo, las enfermedades que aumentan la presión sólo en el lecho esplácnico, como la trombosis de la vena porta causan ascitis rara vez.

No obstante, la linfa esplácnica contribuye en un grado significativo a la formación de ascitis cirrótica (4).

2.4.2.2. Formación de linfa hepática.

El revestimiento endotelial de los sinusoides hepáticos es discontinuo, y no limita con eficacia la pérdida de proteínas plasmáticas en caso de aumentos ligeros de la presión sinusoidal. Así, en contraste con lo que sucede en los intestinos, el gradiente oncótico entre sinusoides y espacio extravascular es reducido, y gran parte del líquido que penetra en el espacio intersticial no regresa al espacio vascular. Por éstas razones, la concentración de proteínas plasmáticas no es un factor importante en la patogénesis de la ascitis asociada con hepatopatía.

Estas grandes cantidades de líquido que se pierden hacia el espacio intersticial deben regresar al espacio vascular a través de los linfáticos hepáticos. Cuando la formación de linfa rebasa la eliminación, el líquido sale fuera de los linfáticos y hacia la cavidad peritoneal.

Las enfermedades que causan aumentos notables de la presión sinusoidal, por ejemplo, cirrosis y trombosis de vena hepática, con frecuencia producen ascitis (4).

2.4.2.3. Manifestaciones clínicas.

Los pacientes con ascitis refieren aumento de la amplitud abdominal. Las pequeñas cantidades de ascitis se pueden identificar por ultrasonido abdominal. Una vez que se sospecha la existencia de ascitis, deberá practicarse paracentesis (punción quirúrgica de una cavidad u órgano para la evacuación de líquido acumulado o para extraer una muestra de éste para su examen).

Las características del líquido ascítico en la cirrosis son variables; sin embargo, 80 a 90% de los pacientes muestran concentraciones de proteínas de menos de 3 g por decilitro. El número de leucocitos es menor de 500 por mm^3 en 90% de los pacientes con cirrosis y predominan las células mononucleares (75%) (4).

2.5. DEFENSAS DEL ORGANISMO CONTRA LA INFECCION.

La fagocitosis es un mecanismo de defensa inmune inespecífica y representa el contacto inicial del huésped con agentes extraños como microorganismos, glóbulos viejos, células lesionadas, etc. Existe un término más general, el de endocitosis, que es la entrada de un cuerpo o sustancia a una célula.

La fagocitosis es la endocitosis de células o partículas de materia, en tanto que la pinocitosis se refiere a la entrada de líquidos (6,8). La fagocitosis es facilitada por los anticuerpos, ya que las partículas o sustancias extrañas cubiertas por éstos son ingeridas de manera más eficaz; también puede intervenir como amplificador de la fagocitosis el complemento (serie de proteínas séricas que entablan reaccio-

nes en cadena). Este proceso facilitador de la fagocitosis común al anticuerpo y al complemento se ha designado como opsonización (8,9).

2.5.1. Células fagocíticas.

Las principales células fagocíticas en el hombre son -- los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos y los fagocitos mononucleares (8,9,10). Los polimorfonucleares neutrófilos re presentan del 60 al 70% de los glóbulos blancos en la sangr -- periférica del hombre y constituyen una de las primeras lí--- neas de defensa del organismo contra las infecciones.

El núcleo del neutrófilo tiene 3 a 5 lóbulos unidos por hilos estrechos de cromatina. El neutrófilo maduro es primordialmente una célula fagocitaria con dos tipos diferentes de gránulos; éstos gránulos son conocidos como gránulos prima--- rios o azurófilos que contienen mieloperoxidasa, proteínas ca tiónicas, mucopolisacáridos ricos en azufre, fosfatasa ácida y varias hidrolasas más; y los gránulos secundarios o especí ficos que contienen gran cantidad de fosfatasa alcalina, lac toferrina y lisozima. En el neutrófilo maduro, 80 a 90% de -- los gránulos son específicos y 10 a 20% son azurófilos. Estos dos tipos de gránulos revisten gran importancia para el desdo blamiento de las sustancias fagocitadas y la destrucción de -- los microorganismos.

Los neutrófilos permanecen aproximadamente 5 a 8 horas en la sangre periférica y son capaces de abandonar la circula ción en el curso de una inflamación, atravesando los vasos -- sanguíneos y pasando a los tejidos por un fenómeno conocido -- como diapédesis. Una vez que llegan a los espacios extravascu lares los neutrófilos sólo sobreviven algunos días (8,9,10).

Los fagocitos mononucleares incluyen tanto los monocitos de la sangre circulante como los macrófagos que existen en diversos tejidos (11,12). Las células que conforman este sistema de fagocitos mononucleares tienen su origen en el monoblasto y promonocito de la médula ósea. Sólo la etapa celular intermedia, el monocito, es hallada ordinariamente en la circulación.

Estas células tienen una estancia menor de 3 días en la sangre periférica; posteriormente, los monocitos migran hacia los tejidos. A diferencia de los neutrófilos éstos no mueren cuando abandonan la circulación sino que maduran convirtiéndose en macrófagos (histiocitos) en los tejidos, macrófagos alveolares (pulmón), células de Kupffer (hígado) y macrófagos de los sinusoides del bazo, ganglios linfáticos, peritoneo y otras zonas (9,11,12). La maduración de los macrófagos va acompañada por un aumento en el tamaño celular y en el número de los organelos citoplasmáticos incluyendo las mitocondrias y los lisosomas (que contienen las enzimas hidrolíticas). También se incrementa su capacidad fagocítica.

En los tejidos los macrófagos tienen larga vida y con frecuencia sobreviven semanas o meses (11). Además de su función de defensa los macrófagos juegan un papel importante en la iniciación, regulación y expresión de respuestas inmunes específicas; la habilidad de los macrófagos para llevar antígenos y presentarlos a linfocitos inmunocompetentes es un proceso necesario para la inducción de respuestas inmunes a muchos antígenos.

2.5.2. Fagocitosis

El fenómeno de la fagocitosis consta de cuatro etapas:-

quimiotaxis, adherencia, ingestión y destrucción. La quimiotaxis es la capacidad de las células móviles para reconocer y responder a un gradiente adecuado con emigración direccional. Entre los agentes quimiotácticos se encuentran componentes -- del sistema de complemento, productos bacterianos, de leucocitos estimulados, de la coagulación, etc. La adhesión de las células fagocíticas es el resultado de interacciones entre -- factores celulares y factores extracelulares. También depende de la naturaleza de las partículas que se han de ingerir.

La ingestión es la etapa en la cual la partícula inerte o viva penetra al interior del citoplasma del fagocito. Esta ingestión se asocia a una invaginación de la membrana de la célula, después las extremidades de ésta invaginación se fusionan para constituir una vacuola (fagosoma).

Posteriormente los gránulos lisosómicos se fusionan con las porciones de la membrana plasmática que constituyen la vacuola fagocítica. La fusión de las membranas provoca la descarga de las enzimas lisosómicas (desgranulación) y la estructura resultante se denomina fagolisosoma; finalmente por medio de las enzimas la partícula inerte o viva puede ser digerida y expulsada por exocitosis (8,9,13).

2.6. FACTORES QUE CONTRIBUYEN A INCREMENTAR LA SUSCEPTIBILIDAD A LA INFECCION EN LOS PACIENTES CIRROTICOS.

Es común en la cirrosis hepática la infección bacteriana severa y se han reportado varios aspectos que podrían influir para incrementar la susceptibilidad de los pacientes cirróticos a la infección.

Se ha encontrado una quimiotaxis defectuosa en el suero de pacientes cirróticos y se ha observado que éste efecto se-

debe a la presencia de inhibidores quimiotácticos, los cuales actúan directa e irreversiblemente sobre los factores quimiotácticos (14,15).

Estos inhibidores de la quimiotaxis son estables a 56°C por 40 minutos, tienen coeficientes de sedimentación de 6.8 y 10.7 S y migran en la zona de electroforesis β .

La quimiotaxis también puede estar disminuída debido a los bajos niveles de complemento encontrados en los pacientes cirróticos, ya que el hígado sintetiza el componente C3a del complemento, siendo éste un agente quimiotáctico muy importante (16).

También se ha observado que el alcohol disminuye la quimiotaxis de los leucocitos (17).

La adherencia de los granulocitos al endotelio vascular es necesaria antes de su diapédesis hacia el sitio de infección. En pacientes cirróticos se han mostrado alteraciones en la adherencia de los neutrófilos. Wozniak, K.J. y cols. en un estudio realizado con alcohólicos crónicos observaron que la adherencia granulocítica se redujo a las dos horas y media después de la administración de etanol y que el incremento de la adherencia ocurría predominantemente dentro de las 12 a 48 horas después de suprimir el alcohol (17).

La adherencia granulocítica también depende de los componentes del sistema de complemento y en estudios "in vitro" del tiempo de exposición a fibra de nylon o a monocapas de cultivo de tejido (18,19).

La función del monocito se encuentra alterada en la cirrosis hepática. Hassner, A. y cols. realizaron un estudio en

el que midieron la fagocitosis y destrucción de 2 especies de *Candida*, encontrándose disminuidas ambas en comparación con las pruebas realizadas con monocitos de sujetos sanos (20).

Se ha observado que la función del sistema de fagocitos mononucleares en los pacientes cirróticos se encuentra deprimida. Este sistema constituye una parte importante de la defensa celular del huésped, en la remoción y degradación de bacterias, endotoxinas, microagregados de fibrina, células de tumores y material extraño presente en la sangre. Ha sido estimado que 5 a 7% del número total de células hepáticas son macrófagos fijos (células de Kupffer), conformando 80 a 85% del total del sistema de fagocitos mononucleares. Al estar debilitada la capacidad fagocítica de éste sistema existe un mayor riesgo de adquirir infecciones bacterianas (21,22).

2.7. PERITONITIS BACTERIANA ESPONTANEA EN PACIENTES CON CIRROSIS HEPATICA.

Los pacientes con cirrosis hepática y ascitis pueden desarrollar peritonitis bacteriana espontánea. La frecuencia de ésta complicación en pacientes con ascitis parece que va en aumento y el reconocimiento temprano es esencial (la mortalidad rebasa 60 a 90%) (2,23).

Puede ayudar en el diagnóstico la existencia de fiebre, dolor o hipersensibilidad abdominal; los enfermos pueden ser asintomáticos y el diagnóstico es sugerido sólo por el hallazgo de aumento en el número de leucocitos en líquido ascítico o cultivo positivo del mismo. Algunos autores consideran que una cuenta de leucocitos mayor de 500 cel/mm³ o 250 polimorfonucleares por mm³ es indicativa de peritonitis bacteriana --

espontánea (23,24).

La determinación del pH del fluido ascítico es una prueba muy útil en el diagnóstico de peritonitis bacteriana espontánea. En un estudio se refiere un pH del fluido ascítico de 7.25 ± 0.06 en pacientes con peritonitis bacteriana, mientras que en el fluido ascítico de pacientes sin peritonitis bacteriana el pH fue de 7.47 ± 0.03 . Esta determinación es fácil, rápida, sensible y proporciona un diagnóstico confiable de peritonitis bacteriana espontánea (25).

Se ha observado que cuando se provoca diuresis en pacientes cirróticos con ascitis, disminuyéndola, y posteriormente se determina la actividad opsónica en el líquido ascítico, ésta se halla incrementada, lo que puede ayudar a prevenir la peritonitis bacteriana espontánea (26).

2.8 HIPERGAMMAGLOBULINEMIA EN LA CIRROSIS HEPATICA.

La hipergammaglobulinemia es una característica bien conocida en la enfermedad hepática crónica. Se cree que la patogénesis de ésta hipergammaglobulinemia se debe a un incremento en la síntesis más que a una falta de degradación de inmunoglobulinas (27,28).

En la enfermedad hepática crónica, con hipertensión portal y circulación colateral, pueden ser propuestos 2 mecanismos principales para explicar el aumento de estímulos antigénicos sistémicos: 1) debido a la circulación colateral secundaria a hipertensión portal, los antígenos y endotoxinas absorbidos desde el tracto gastrointestinal pueden alcanzar la circulación sistémica, y ponerse en contacto con las células productoras de anticuerpos.

2) En la enfermedad hepática puede haber alteración en la captación o inactivación de antígenos procedentes del intestino, como resultado directo del daño celular, lo que provoca que puedan llegar a la circulación sistémica y constituir un estímulo antigénico (27,28).

En los pacientes cirróticos se encuentran altos títulos de anticuerpos contra bacterias intestinales como Escherichia coli, lo cual confirma la presencia de antígenos entéricos -- circulantes (29,30).

2.9. GAMMAGRAFIA HEPATICA

2.9.1. Definición

La gammagrafía hepática consiste en la reproducción sobre papel o placa fotográfica de la radiación gamma emitida por el hígado después de la inyección de un isótopo radioactivo capaz de ser captado selectivamente por éste órgano (1).

2.9.2. Aplicaciones

Es un estudio muy útil ya que proporciona información -- sobre la medida, forma, posición del hígado y principalmente de las lesiones que presente éste órgano. Por -- ejemplo, las hepatopatías difusas, fundamentalmente la cirrosis hepática, presentan una imagen de falta de homogeneidad en la captación del isótopo, debido a la -- existencia de alteraciones vasculares que dejan sin perfundir zonas más o menos extensas del sistema de fagocitos mononucleares.

En tales casos aparece, por lo general, una captación -- extrahepática evidente localizada en bazo, columna vertebral, pulmón, etc. (1,31).

C A P I T U L O I I I

DISEÑO EXPERIMENTAL.

3.1. OBJETIVOS:

- Determinar el Índice fagocítico en pacientes con cirrosis hepática.
- Comparar el Índice fagocítico de los pacientes - cirróticos con el de sujetos sanos.
- Observar la influencia de la ascitis sobre el Índice fagocítico.
- Establecer si existe correlación del Índice fagocítico con la insuficiencia hepática, hipertensión portal e hiperesplenismo.

3.2 HIPOTESIS

El Índice fagocítico está alterado en forma proporcional al grado de insuficiencia hepática, hipertensión portal e hiperesplenismo en los pacientes cirróticos.

3.3. MATERIAL Y METODOS.

3.3.1. Material de laboratorio:

- Aguja estériles marca "YALE" 20 x 38 mm.
- Jeringas de plástico de 10 ml. "JERIPLAS".
- Pipeta de Sahli. "PROPPER TROPHY"
- Pipeta de Thoma para glóbulos blancos y glóbulos rojos. "PROPPER TROPHY".
- Cámara de Neubauer. "AMERICAN OPTICAL".
- Cubrehematímetro. "NBS".
- Tubos capilares de 75 mm "PROPPER".
- Portaobjetos para microscopio de 26 x 76 mm. "MADESA".
- Cubreobjetos de 22 x 22 mm. "MADESA".
- Tubos de ensaye (12 x 75 mm. y 13 x 100 mm.) "PYREX".
- Celdillas para espectrofotómetro 12 x 75 mm. "PROFESIONAL".
- Pipetas graduadas de 0.1, 1.0, 2.0, 5.0 y 10 ml. "IVA".
- Cámara húmeda.
- Gradilla para tubos de ensaye.
- Tubos de vidrio con tapón de rosca. "PYREX"
- Papel seda "LENS PAPER" No. 6525.
- Papel Parafilm "AMERICAN CAN COMPANY"
- Cajas de Petri "KIMAX"
- Torundas alcoholadas.
- Gasas y algodón.
- Boquilla y ligadura de goma.
- Matraz aforado 100 ml. "PYREX".

MATERIAL BIOLÓGICO: sangre completa y suero.

3.3.2. EQUIPO:

- Espectrofotómetro. Coleman Junior 11. Modelo 6/20.
- Centrifuga clínica. B.H.G. Modelo Optima 11.
- Microcentrifuga. Sol Bat. Modelo J-12.
- Agitador mecánico de pipetas. Modelo J-15.
- Contador (piano) Clay-Adams. Laboratory Counter.
- Incubadora. MAPSA. Modelo V-75.
- Microscopio. Leitz Wetzlar. Modelo Dialux.
- Cámara de Anger. Modelo Scintiview Siemens.

3.3.3. REACTIVOS:

- Solución anticoagulante de Versenato de sodio al 10%.
- Solución de Drabkin (Cianometahemoglobina).
- Solución estandar de Cianometahemoglobina (Acuglobin).
- Líquido de Turk (diluyente para glóbulos blancos).
- Solución de Oxalato de amonio al 1%
- Colorante de Wright (para recuento diferencial)
- Solución amortiguadora de fosfatos, pH=6.4
- Aceite de inmersión. "Sigma Zeiss" No. 6525.
- Diazo blanco
- Diazo reactivo para determinación de bilirrubinas.
- Metanol
- Sustrato TGO
- Sustrato TGP
- Solución de Hidróxido de sodio 0.4 N.
- Solución de Cloruro de sodio 0.85%.
- Reactivo de Biuret
- Verde de Bromocresol
- Partículas de Látex
- Solución de Hanks
- Coloide de azufre marcado con ^{99m}Tc .

NOTA: Los reactivos utilizados son preparados por el Instituto Mexicano del Seguro Social. Subdirección General de Abastos para Reactivos. (Ver preparación en el Anexo No. 5).

3.4 CONSIDERACIONES PREVIAS A LA TOMA DE LA MUESTRA.

Se establecieron dos grupos de estudio formados de la siguiente manera:

Grupo 1: 10 pacientes cirróticos con ascitis.

Grupo 11: 10 pacientes cirróticos sin ascitis.

Fueron incluidos en el estudio pacientes cirróticos con insuficiencia hepática y/o hipertensión portal.

Los pacientes eran excluidos si presentaban:

- Hemorragia a cualquier nivel, básicamente del tubo digestivo.
- Coma hepático.
- Insuficiencia renal.
- Infección.
- Diabetes.

La selección de éstos pacientes se realizó acudiendo a la consulta que imparte el Servicio de Medicina Interna, la cual se efectúa quincenalmente, así como entre los pacientes hospitalizados, con la ayuda del asesor médico del trabajo.

También se contó con un grupo testigo constituido por 10 sujetos clínicamente y por estudios de gabinete sanos.

3.5. DESARROLLO DEL TRABAJO

A los pacientes incluidos en el estudio se les realizaron las siguientes determinaciones:

- + Biometría hemática (Anexo No. 1)
 - Concentración de hemoglobina
 - Hematocrito
 - Cuenta de leucocitos
 - Recuento diferencial de leucocitos
- + Cuantificación de plaquetas (Anexo No. 1)
- + Pruebas de funcionamiento hepático (Anexo No. 2)
 - Bilirrubina directa e indirecta
 - Transaminasa glutámica oxalacética
 - Transaminasa glutámica pirúvica
 - Proteínas totales
 - Albúmina
- + Determinación del Índice Fagocítico
Se hicieron tres cuantificaciones en días alternados para obtener un valor promedio.
- + Gammagrama hepato-esplénico. (Anexo No. 4).

NOTA: Las técnicas utilizadas se localizan en los Anexos -
1, 2, 3 y 4.

C A P I T U L O I V

RESULTADOS.

En las Tablas No. 1 y 2 se observan los resultados de los parámetros hematológicos de los pacientes con ascitis y sin ascitis, respectivamente. Se aprecia que en algunos pacientes se presentan valores de hemoglobina, hematocrito y leucocitos bajos.

Es importante mencionar que se presentó linfocitopenia en 4 pacientes con ascitis y sólo en un paciente sin asciti (Tabla No. 3).

Las pruebas de funcionamiento hepático de los pacientes con ascitis y sin ascitis se muestran en las Tablas No. 4 y 5. Se aprecian alteraciones principalmente en las concentraciones de bilirrubinas y de albúmina y globulinas (Obsérvese la relación albúmina/globulinas).

Los resultados que se muestran en las Tablas 1 a 5 son valores promedio de dos determinaciones.

En la Gráfica No. 1 se compara el Índice fagocítico en los grupos de estudio, apreciándose valores más altos en el grupo testigo que en los dos grupos de pacientes cirróticos. Se observa una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo testigo y los pacientes con ascitis y sin ascitis ($p < 0.001$); sin embargo, no se observan diferencias entre los dos grupos de pacientes cirróticos (Tabla No. 6).

En la Tabla No. 7 se correlacionan los parámetros hematológicos con el Índice fagocítico, la correlación más alta encontrada corresponde a los neutrófilos ($r=0.68$) en el grupo de pacientes sin ascitis.

En la Tabla No. 8 se correlacionan las pruebas de funcionamiento hepático con el Índice fagocítico, observándose

que sólo las concentraciones de bilirrubina indirecta y las de transaminasa glutámico pirúvica presentan correlaciones significativas, ambas en el grupo de pacientes sin ascitis.

En la Gráfica No. 2 se muestra la captación del coloide de azufre en los grupos de estudio, se aprecia que el grupo testigo presenta menor porcentaje de captación que los dos grupos de pacientes cirróticos.

En la Tabla No. 10 se compara la captación del coloide en los grupos estudiados y se observa una diferencia significativa entre el grupo testigo y los pacientes con ascitis con $p < 0.001$ y entre los dos grupos de pacientes cirróticos con $p < 0.05$, pero no se observan diferencias entre el grupo testigo y los pacientes sin ascitis.

En la Tabla No. 11 se correlacionan la captación del coloide con las pruebas de funcionamiento hepático, se observan varias correlaciones significativas: bilirrubinas directa e indirecta, transaminasa glutámico oxalacética y pirúvica en los pacientes con ascitis; y en los pacientes sin ascitis las de bilirrubina directa e indirecta.

Las correlaciones obtenidas entre la captación del coloide de azufre y el Índice fagocítico son: en los pacientes con ascitis $r = -0.35$, en los pacientes sin ascitis $r = -0.33$ y en el grupo testigo $r = -0.31$.

Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante la prueba "t" de Student para muestras independientes e Índice de correlación de Pearson (r).

T A B L A No. 1

RESULTADOS DE PARAMETROS HEMATOLOGICOS.

PACIENTES CON ASCITIS:

No.	Hb (g/dl)	Ht. (%)	Leuc. (cel/mm ³)	Segm. (%)	Linf. (%)	Plaquet. (cel/mm ³)
1	10.2	32	4900	64	18	196 000
2	8.6	28	5200	39	52	190 000
3	15.8	44	5350	57	34	356 000
4	9.6	32	8000	60	35	348 000
5	15.2	41	6150	84	12	228 000
6	15.1	48	2850	42	56	312 000
7	6.2	25	3050	43	56	334 000
8	15.2	48	3900	81	19	122 000
9	8.8	30	9800	74	24	198 000
10	9.9	32	6700	80	14	136 000

T A B L A No. 2

RESULTADOS DE PARAMETROS HEMATOLÓGICOS.

PACIENTES SIN ASCITIS:

No.	Hb (g/dl)	Ht (%)	Leuc. (cel/mm ³)	Segm. (%)	Linf. (%)	Plaq. (cel/mm ³)
1	13.9	43	5500	41	52	220 000
2	13.2	45	2100	46	50	330 000
3	10.8	33	2500	52	46	188 000
4	12.8	38	3450	65	33	184 000
5	11.7	34	5500	57	35	224 000
6	9.2	30	7000	79	18	114 000
7	14.3	43	3950	15	80	138 000
8	10.7	35	7900	87	9	208 000
9	15.2	47	3200	62	32	136 000
10	10.7	35	6800	77	23	394 000

T A B L A No. 3

RELACION DE LAS CIFRAS DE LINFOCITOS EN VALORES
ABSOLUTOS.

PACIENTES CON ASCITIS.	PACIENTES SIN ASCITIS.
+882	2860
2704	1050
1819	1150
2800	1138
+738	1925
1596	1260
1708	3160
+741	+711
2352	1024
+938	1564

+ Pacientes con linfocitopenia.

T A B L A No. 4

RESULTADOS DE PRUEBAS DE FUNCIONAMIENTO HEPATICO.

PACIENTES CON ASCITIS:

No.	B.O. (mg/dl)	B.I. (mg/dl)	TGO. (U)	TGP. (U)	ALB. (g/dl)	GLOB. (g/dl)	P. TOT. (g/dl)	A/G.
1	0.6	1.8	54	16	1.7	6.3	8.0	0.26
2	1.8	0.8	54	18	2.4	4.2	6.6	0.57
3	0.6	1.4	26	22	4.0	3.4	7.4	1.17
4	2.0	2.3	72	28	2.3	4.3	6.6	0.53
5	2.0	2.3	120	30	1.9	4.5	6.4	0.42
6	0.3	0.5	60	39	3.2	5.0	8.2	0.64
7	0.5	1.8	40	24	3.2	3.2	6.4	1.00
8	0.8	0.4	66	22	3.2	3.0	6.2	1.06
9	3.9	7.9	20	14	2.6	4.2	6.8	0.61
10	1.6	5.1	24	16	3.6	3.9	7.5	0.92

T A B L A No. 5

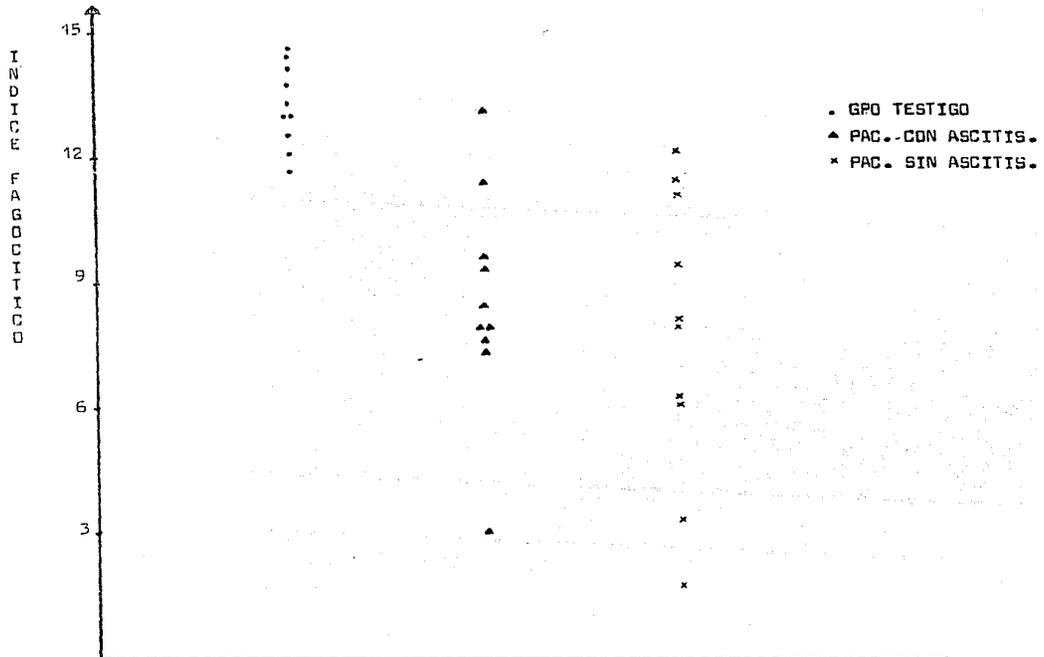
RESULTADOS DE PRUEBAS DE FUNCIONAMIENTO HEPATICO.

PACIENTES SIN ASCITIS:

No.	B.D. (mg/dl)	B.I. (mg/dl)	TGO. (U)	TGP. (U)	ALB. (g/dl)	GLOB. (g/dl)	P. TOT. (g/dl)	A/G.
1	1.4	0	108	108	4.3	4.0	8.3	1.07
2	0.5	0.7	120	51	3.8	3.6	7.4	1.05
3	0.8	0.6	12	12	2.2	7.3	9.5	0.30
4	0	1.4	94	34	2.6	4.3	6.9	0.60
5	0	0.5	26	14	1.2	4.0	5.2	0.30
6	0	1.6	40	38	1.7	4.0	5.7	0.42
7	1.2	0.6	94	61	3.2	4.6	7.8	0.69
8	1.4	1.5	50	24	2.8	2.9	5.7	0.96
9	1.6	0	32	24	3.1	3.6	6.7	0.86
10	1.0	0.4	60	42	3.0	5.9	8.9	0.50

GRAFICA No. 1

CUANTIFICACION DEL INDICE FAGOCITICO EN LOS GRUPOS DE ESTUDIO.



T A B L A No. 6

COMPARACION DEL INDICE FAGOCITICO EN LOS GRUPOS DE ESTUDIO.

GRUPO	n	t exp.	t tables	CONCL.
GRUPO 1	10	4.76	2.10	$p < 0.001$
GPO TESTIGO	10			
GRUPO 11	10	4.94	2.10	$p < 0.001$
GPO TESTIGO	10			
GRUPO 1	10	0.61	2.10	n.s.
GRUPO 11	10			

GRUPO 1 = PACIENTES CON ASCITIS.

GRUPO 11 = PACIENTES SIN ASCITIS.

* no significativa.

T A B L A No. 7

CORRELACION DE PARAMETROS HEMATOLOGICOS CON EL
INDICE FAGOCITICO.

PARAMETRO	<u>GRUPO 1</u>		<u>GRUPO 11</u>	
	r	Concl.	r	Concl.
Segmentados	0.37	⁺ n.s.	0.68	p < 0.005
Linfocitos	-0.27	n.s.	-0.66	p < 0.005
Plaquetas	0.14	n.s.	0.19	n.s.

⁺no significativa.

GRUPO 1 = Pacientes con ascitis.

GRUPO 11 = Pacientes sin ascitis.

T A B L A No. 8

CORRELACION DE PRUEBAS DE FUNCIONAMIENTO HEPATICO
CON EL INDICE FAGOCITICO.

PRUEBA	<u>GRUPO I</u>		<u>GRUPO 11</u>	
	r	Concl.	r	Concl.
B.D.	-0.28	⁺ n.s.	-0.32	n.s.
B.I.	-0.14	n.s.	0.67	p < 0.005
TGO.	0.01	n.s.	-0.04	n.s.
TGP.	0.27	n.s.	-0.53	p < 0.025
Alb.	0.41	n.s.	-0.21	n.s.
Glob.	-0.29	n.s.	-0.31	n.s.

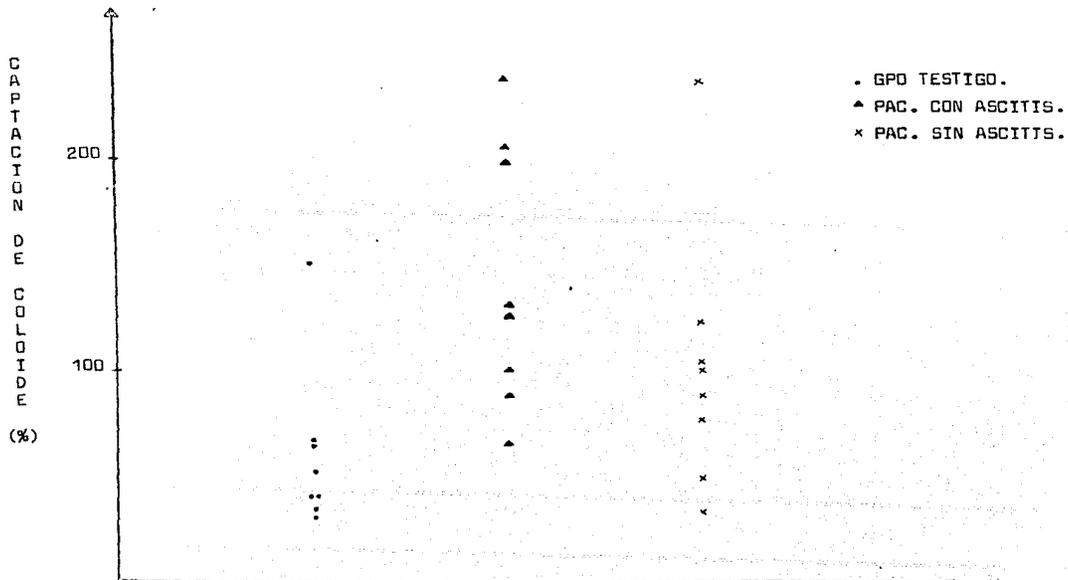
⁺no significativa.

GRUPO 1 = Pacientes con ascitis.

GRUPO 11 = Pacientes sin ascitis.

GRAFICA No. 2

CAPTACION DE COLOIDE DE AZUFRE MARCADO CON ^{99m}Tc EN BAZO/HIGADO
EN LOS GRUPOS DE ESTUDIO.



T A B L A No. 9

COMPARACION DE LA CAPTACION DE COLOIDE DE AZUFRE MARCADO CON
^{99m}Tc EN BAZO/HIGADO EN LOS GRUPOS DE ESTUDIO.

GRUPO	n	t _{exp.}	t _{tablas}	CONCL.
GRUPO 1	10	-4.22	2.14	p < 0.001
GPO TESTIGO	10			
GRUPO 11	10	-1.57	2.14	n.s.
GPO TESTIGO	10			
GRUPO 1	10			
GRUPO 11	10	2.32	2.14	p < 0.05

GRUPO 1 = PACIENTES CON ASCITIS.

GRUPO 11 = PACIENTES SIN ASCITIS.

*no significativa.

T A B L A No. 10

CORRELACION DE PARAMETROS HEMATOLOGICOS CON
LA CAPTACION DE COLOIDE DE AZUFRE MARCADO -
CON ^{99m}Tc EN BAZO/HIGADO.

PARAMETRO	<u>GRUPO 1</u>		<u>GRUPO 11</u>	
	r	Concl.	r	Concl.
Segmentados.	0.46	⁺ n.s.	0.02	n.s.
Linfocitos	-0.61	p<0.025	-0.12	n.s.
Plaquetas	-0.43	n.s.	-0.43	n.s.

⁺no significativa

GRUPO 1 = Pacientes con ascitis.

GRUPO 11 = Pacientes sin ascitis.

T A B L A No. 11

CORRELACION DE PRUEBAS DE FUNCIONAMIENTO HEPATICO CON
LA CAPTACION DE COLOIDE DE AZUFRE MARCADO CON ^{99m}Tc -
EN BAZO/HIGADO.

PRUEBA	<u>GRUPO 1</u>		<u>GRUPO 11</u>	
	r	Concl.	r	Concl.
B.D.	0.58	p<0.025	0.69	p<0.005
B.I.	0.80	p<0.0005	-0.64	p<0.01
TGO.	-0.69	p<0.005	-0.38	⁺ n.s.
TGP.	-0.83	p<0.0005	0.02	n.s.
Alb.	-0.27	n.s.	0.13	n.s.
Glob.	0.30	n.s.	0.25	n.s.

⁺no significativa.

GRUPO 1 = Pacientes con ascitis.

GRUPO 11 = Pacientes sin ascitis.

C A P I T U L O V

ANÁLISIS DE RESULTADOS.

En los pacientes con cirrosis hepática se presenta con frecuencia una susceptibilidad incrementada a las infecciones bacterianas. En éste estudio se observó un Índice fagocítico disminuido en los pacientes cirróticos, al compararse con sujetos sanos.

Respecto a la captación del coloide de azufre marcado -- con ^{99m}Tc en bazo/hígado se observó que los pacientes con ascitis presentaron una captación promedio mayor (144.83%) que los pacientes sin ascitis (101.4%) y el grupo testigo (60.58%), debido probablemente a que los pacientes con ascitis presentan mayor hipertensión portal, considerando la captación del coloide como un índice de hipertensión portal (31). Esta consideración ha sido hecha para evitar la medición de la presión portal directamente en el paciente, ya que es un estudio agresivo y riesgoso.

La captación del coloide es medida realizando un Gamma--grama Hepato-esplénico a los pacientes (Técnica en el Anexo No. 4).

En éste estudio sólo fue posible realizar el Gammagrama a 8 pacientes con ascitis, 8 sin ascitis y 8 sujetos sanos, debido a fallas del aparato.

En cuanto a los parámetros hematológicos la anemia que se presenta en algunos pacientes cirróticos, puede ser debida a una nutrición deficiente (ya que muchos pacientes cirróticos lo son por alcoholismo) o por una función excesiva del bazo.

La alteración de las pruebas de funcionamiento hepático indican el daño que sufre el hígado, en los pacientes con ascitis se encontraron concentraciones elevadas de bilirrubina di

recta e indirecta, lo cual concuerda con lo reportado en la literatura; en los pacientes cirróticos, debido a la alteración del hepatocito a menudo existe deficiencia en las tres fases principales del metabolismo de la bilirrubina: captación, conjugación y excreción, llegando a encontrarse concentraciones elevadas en suero, tanto de bilirrubina directa como indirecta (32).

Se observa en las Tablas 4 y 5 que las concentraciones de transaminasa glutámico oxalacética se encuentran moderadamente elevadas en los dos grupos de pacientes y que las concentraciones de transaminasa glutámico pirúvica son normales en los pacientes con ascitis y ligeramente elevadas en los pacientes sin ascitis; éstos resultados también concuerdan con lo que se reporta en la literatura. En la cirrosis hepática, que es una enfermedad crónica, la moderada elevación de la transaminasa glutámico oxalacética y el nivel normal de la transaminasa glutámico pirúvica contrastan con los encontrados en las enfermedades agudas del hígado como la hepatitis viral aguda, en la que se encuentran niveles excesivamente elevados de ambas transaminasas (32).

Así mismo, la disminución de la albúmina sérica es otro hallazgo característico de la enfermedad hepática crónica, así como el aumento de las globulinas; ambas alteraciones se observaron en éste estudio.

En cuanto a las correlaciones de los parámetros hematológicos con el Índice fagocítico, se observa que al aumentar el número de neutrófilos aumenta el Índice fagocítico, lo cual se esperaba ya que éstas células son principalmente fagocíticas y constituyen una de las primeras líneas de defensa del organismo contra las infecciones (8,9,10). En los pacientes sin ascitis la correlación es fuerte ($r=0.58$), en los pacientes con -

ascitis la relación también es directa pero con un índice de correlación menor ($r=0.37$).

Los linfocitos correlacionaron de forma inversa en los 2 grupos de pacientes, observándose una correlación más fuerte - en los pacientes sin ascitis ($r=-0.66$), debido probablemente - al efecto indirecto que tienen en la fagocitosis.

Se aprecia que al aumentar las concentraciones de bilirrubina directa e indirecta en los pacientes con ascitis, disminuye el Índice fagocítico; aunque las correlaciones halladas no son significativas se puede deber a que éstos pacientes presentan mayor daño hepático.

En los pacientes sin ascitis aumenta el Índice fagocítico al aumentar la concentración de bilirrubina indirecta; sin embargo, en éste grupo de pacientes los valores de bilirrubina indirecta no se encuentran elevados, indicando menor daño hepático.

Con respecto a las correlaciones de los parámetros hematológicos con la captación del coloide se observó una relación inversa de los linfocitos en los pacientes con ascitis, es decir, al aumentar la captación del coloide disminuye el número de linfocitos, indicando posiblemente que en éstos pacientes - existe hiperesplenismo y por tanto hay destrucción de éstas células en el bazo (en éste grupo de pacientes se presentó linfocitopenia, que además se asoció a la mortalidad en tres pacientes).

Las plaquetas en los dos grupos de pacientes cirróticos correlacionaron en forma inversa con la captación del coloide al aumentar la captación en bazo/hígado disminuyó la concentración de plaquetas, sin embargo, las correlaciones no son estadísticamente significativas.

En cuanto a las correlaciones de las pruebas de funcionamiento hepático con la captación del coloide, se observó que a medida que aumenta el porcentaje de captación aumentan las concentraciones de bilirrubina directa e indirecta en los pacientes con ascitis, y las de la bilirrubina directa en los pacientes sin ascitis indicando que el aumento de la captación se puede deber a mayor daño hepático.

La disminución de las concentraciones de transaminasa - glutámico oxalacética y pirúvica al aumentar la captación del coloide puede indicar que el daño es crónico, es decir, la enfermedad ha estado presente por mucho tiempo; cuando la enfermedad es aguda la liberación de enzimas es excesiva, principalmente de la transaminasa glutámico pirúvica.

Aunque las correlaciones de albúmina y globulinas con la captación del coloide no son estadísticamente significativas se puede apreciar que las globulinas aumentan en proporción directa a la captación del coloide, indicando posiblemente que a mayor hipertensión portal existe mayor paso de antígenos a la circulación sistémica, los cuales pueden ponerse en contacto con las células productoras de anticuerpos.

Se observó disminución del Índice fagocítico a medida que aumenta la captación del coloide, siendo ligeramente más marcada ésta disminución en los pacientes con ascitis.

C A P I T U L O V I

CONCLUSIONES.

- En éste estudio se observó que el Índice fagocítico de los polimorfonucleares neutrófilos se encuentra disminuido en los pacientes cirróticos, al compararse con el de sujetos sanos.
- No se encontró diferencia significativa entre el Índice fagocítico de los pacientes cirróticos con ascitis y los pacientes sin ascitis.
- En los pacientes cirróticos con ascitis el porcentaje de captación del coloide en bazo/hígado fue mayor que en los pacientes sin ascitis y el grupo testigo, indicando mayor daño hepático y por tanto mayor hipertensión portal en los pacientes con ascitis.
- El Índice fagocítico disminuyó al aumentar la captación del coloide, siendo ligeramente mayor la disminución en los pacientes con ascitis.
- Los linfocitos y plaquetas disminuyeron al aumentar la captación del coloide en bazo/hígado, lo que puede indicar una función excesiva del bazo.
- Se observaron mayores concentraciones de bilirrubina directa e indirecta en los pacientes con ascitis, indicando mayor daño hepático.
- Las concentraciones de transaminasa glutámico oxalacética y pirúvica se encontraron moderadamente elevadas en los dos grupos de pacientes cirróticos.

- También se observó incremento en la concentración de globulinas, llegando a invertirse la relación albúmina/globulina en los dos grupos de pacientes cirróticos.

Se propone:

- Para estudios posteriores aumentar el número de muestra-para observar si existe diferencia significativa del Índice fagocítico entre los pacientes cirróticos con ascitis y pacientes sin ascitis.
- Así mismo, se podrían estudiar las características del-fluido ascítico, realizando determinaciones en éste como son concentración de proteínas totales, albúmina, -- cuenta de glóbulos blancos y recuento diferencial de -leucocitos.
- Realizar electroforesis de proteínas para observar las-alteraciones que se pueden presentar en los pacientes -con cirrosis hepática.

C A P I T U L O V I I

A N E X O S.

ANEXO No. I BIOMETRIA HEMATICA.

HEMOGLOBINA. TECNICA DE LA CIANOMETAHEMOGLOBINA.

FUNDAMENTO: Se emplea una solución de ferricianuro y cianuro potásico. El ferricianuro convierte el hierro ferroso - de la hemoglobina en férrico para formar metahemoglobina, - que se combina con el cianuro potásico para formar cianometahemoglobina estable.

PROCEDIMIENTO:

- 1.- Colocar 5 ml. de reactivo de Drabkin (Cianometahemoglobina) en un tubo de ensaye.
- 2.- Agregar 0.02 ml de sangre mezclada con anticoagulante.
- 3.- Mezclar y dejar reposar 10 minutos.
- 4.- Leer en celdilla chica (12 x 75) a 540 nm. Ajustando a 100% T con solución de Drabkin.
- 5.- Extrapolar en curva de calibración, o con un disco de lectura.

VALORES DE REFERENCIA: Hombres 15.5 - 20 gr%
Mujeres 13.5 - 17 gr%

HEMATOCRITO. TECNICA DEL MICROMETODO.

FUNDAMENTO: El hematocrito se basa en la separación de los glóbulos rojos y el plasma cuando se centrifuga la sangre, el paquete de eritrocitos en por ciento es el resultado - que se informa.

PROCEDIMIENTO:

- 1.- Llenar las 2/3 partes de un tubo capilar con ---

sangre mezclada con anticoagulante.

- 2.- Sellar a la flama o con plastilina por el extremo - más distante a la sangre con el objeto de no hemolizarla, efectuando un movimiento de rotación.
- 3.- Una vez que esté completamente sellado se coloca en una microcentrífuga, centrifugar de 10,000 a 12,000 r.p.m. durante 5 minutos.
- 4.- Leer en mm la longitud total y la del paquete eritrocitario.
- 5.- Calcular el por ciento del paquete eritrocitario con relación al volumen total.

VALORES DE REFERENCIA: Hombres $47 \pm 7\%$
Mujeres $42 \pm 5\%$

CUENTA DE GLOBULOS BLANCOS.

FUNDAMENTO: El líquido de Turk que contiene ácido acético glacial lisa los eritrocitos, para que no oscurezcan los leucocitos.

PROCEDIMIENTO:

- 1.- Llenar con sangre mezclada con anticoagulante la pipeta de Thoma para glóbulos blancos hasta la - marca de 0.5.
- 2.- Limpiar la sangre adherida en el exterior de la pipeta con una gasa.
- 3.- Completar hasta la marca de 1.1 con líquido de - Turk.
- 4.- Homogenizar durante 3 minutos en el agitador de pipetas.
- 5.- Colocar el cubrehematímetro sobre la cámara de - Neubauer.
- 6.- Descartar las primeras 4 o 5 gotas de la pipeta,

llenar la cámara por uno de los bordes.

- 7.- Dejar que el líquido penetre lentamente en la su perficie de la cámara.
- 8.- Dejar reposar de 3 a 5 minutos.
- 9.- Observar al microscopio con el objetivo 10 X, con tar los leucocitos en los 4 cuadrantes de los extremos.

VALORES DE REFERENCIA: 5,000 - 10,000 cel/mm³

RECUESTO DIFERENCIAL DE LEUCOCITOS.

FUNDAMENTO. Los distintos tipos de leucocitos contienen - elementos ácidos, básicos y neutros, además de caracterís ticas morfológicas definidas, lo cual permite diferenciar mediante una adecuada tinción cada tipo de célula.

PROCEDIMIENTO:

- 1.- Mezclar homogéneamente bien la sangre con el anticoagulante.
- 2.- Colocar una pequeña gota de sangre en el extremo de un portaobjetos limpio y desengrasado. Utilizando el borde de otro portaobjetos, extender la gota de sangre a lo largo del portaobjetos con movimiento uniforme.
- 3.- Secar al aire la extensión.
- 4.- Colocar el portaobjetos sobre un soporte para tinción en posición horizontal y con la extensión hacia arriba.
- 5.- Cubrir el portaobjetos con el colorante de Wright por 3 minutos (el tiempo de tinción es variable - de acuerdo a la madurez del colorante).
- 6.- Inmediatamente después se adiciona la solución - amortiguadora de fosfatos pH=6.4 sobre el coloranto

te hasta la aparición de un brillo metálico en la superficie. A partir de la aparición del brillo metálico se deja la preparación por 3 o 4 minutos.

- 7.- Lavar el portaobjetos con agua destilada.
- 8.- Secar al aire la extensión.
- 9.- El exámen microscópico de la tinción se realiza en la parte media del frotis, con objetivo de 100X agregando una gota de aceite de inmersión.

VALORES DE REFERENCIA:	Neutrófilos	50 - 70%
	Linfocitos	24 - 38%
	Monocitos	4 - 9%
	Eosinófilos	1 - 3%
	Basófilos	0 - 1%

CUANTIFICACION DE PLAQUETAS.

FUNDAMENTO. Se lisan los eritrocitos con una solución de Oxalato de amonio al 1.0% y se hace cuenta directa de plaquetas con microscopio de contraste de fases en una cámara de Neubauer.

PROCEDIMIENTO:

- 1.- Mezclar homogeneamente bien la sangre con el anticoagulante.
- 2.- Llenar con sangre la pipeta de Thoma para glóbulos rojos hasta la marca de 0.5
- 3.- Limpiar la sangre adherida al exterior de la pipeta con una gasa.
- 4.- Completar hasta la marca de 101 con diluyente de plaquetas (Oxalato de amonio al 1%).
- 5.- Homogenizar por 3 minutos en el agitador de pipetas.
- 6.- Colocar el cubrehematímetro sobre la cámara de Neubauer.
- 7.- Descartar las primeras 5 o 6 gotas de la pipeta, lle

nando la cámara por uno de los bordes.

8.-Dejar reposar durante 15 minutos en una caja de Petri la cual tenga en la base un papel filtro humedecido.

9.- Observar al microscopio con el objetivo de 40X.

10.- Contar las plaquetas en 10 cuadros pequeños (como para recuento de eritrocitos).

VALORES DE REFERENCIA: 140,000 - 450,000/mm³.

ANEXO No. 2. PRUEBAS DE FUNCIONAMIENTO HEPATICO.

BILIRRUBINAS. TECNICA: Malloy-Evelyn.

FUNDAMENTO: El ácido sulfanílico diazotizado se une con la bilirrubina para formar azobilirrubina de color rosa, proporcional a la cantidad de bilirrubina presente en la muestra.

PROCEDIMIENTO. (Semi-micrométodo):

Hacer una dilución: 0.2 ml. de suero problema más - 2.64 ml. de agua destilada.

En 4 tubos:	1	2	3	4
Suero diluido	0.7	0.7	0.7	0.7 ml.
Diazo blanco	0.2	-	0.2	-
Diazo reactivo	-	0.2	-	0.2 "
Agua destilada	0.9	0.9	-	-
Metanol	-	-	0.9	0.9 "

Dejar reposar 20 minutos y leer a 550 nm. Ajustando a 100% T con los tubos 1 y 3.

Preparar el diazo reactivo al momento de usarse:
 10 ml. de diazo A más 0.3 ml. de diazo B diluido.
 Diazo B diluido: 0.1 ml. de diazo B más 9.9 ml. de agua
 destilada.

Tubo No. 2 = B.D. Tubo No. 4 = B.T. B.I. = B.T. - E.D

VALOR DE REFERENCIA: Bilirrubina directa 0 mg%
 Bilirrubina indirecta 0.2 - 0.8mg%

TRANSAMINASA GLUTAMICO OXALACETICA.

TECNICA: Reitman- Frankel.

FUNDAMENTO. La transaminasa glutámica oxalacetica cataliza la transferencia del grupo amino del ácido aspártico al ácido alfa-cetoglutámico, formando como uno de los productos ácido oxalacético que reacciona con la 2,4 dinitro-fenil-hidracina, dando lugar a la cetohidrazona, que en presencia del hidróxido de sodio produce una coloración café intensa,proporcional a la cantidad de cetoácido presente en la muestra.

TRANSAMINASA GLUTAMICO PIRUVICA.

TECNICA: Reitman-Frankel.

FUNDAMENTO. La transaminasa glutámico pirúvica cataliza la transferencia de un grupo amino de la DL-alanina al ácido alfa-cetoglutámico, formando como uno de los productos de la reacción ácido pirúvico que reacciona con la 2,4 dinitro-fenil-hidracina y da origen a la cetohidrazona, que en presenciade hidroxido de sodio produce una coloración café intensa, que es proporcional a la cantidad de ácido pirúvico presente en la muestra.

PROCEDIMIENTO: TGO y TGP.

- 1.- A 1.0 ml. de sustrato precalentado 5 min. a 37 °C agregar 0.2 ml. de suero problema. Mezclar.
- 2.- Incubar a 37 °C por 60 min.
- 3.- A los 25 min. poner a calentar el sustrato TGP, 5 min. después añadir 0.2 ml. de suero problema.
- 4.- Incubar a 37 °C por 30 min.
- 5.- Sacar los dos tubos del baño maria y añadir 1.0 ml de desarrollador de color. Dejar reposar 20 min.
- 6.- Agregar 10 ml. de NaOH 0.4 N. Mezclar.
- 7.- Dejar a temperatura ambiente por 5 min.
- 8.- Leer a 505 nm. Ajustando a 100% T con agua destilada.

Nota: Si la concentración es mayor a 200 U diluir el suero 1:10 con agua destilada y repetir la determinación.

VALORES DE REFERENCIA: TGO 8 - 40 U
TGP 5 - 35 U

PROTEINAS TOTALES.

TECNICA : BIURET.

FUNDAMENTO. Las proteínas dan coloración violeta en presencia de iones cúpricos en solución alcalina, proporcional a la cantidad de proteínas presentes. La reacción es del enlace peptídico de las proteínas.

PROCEDIMIENTO:

- 1.- En un tubo colocar 1.9 ml de solución de Cloruro de sodio 0.85%.
- 2.- Agregar 0.1 ml. de suero problema más 8.0 ml. de reactivo de Biuret.

- 3.- Mezclar y dejar reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- 4.- Leer a 540 nm. Ajustando a 100% T con blanco de reactivos.

VALORES DE REFERENCIA: 6 - 8 gr%.

ALBUMINA. TECNICA: VERDE DE BROMOCRESOL.

FUNDAMENTO. El Verde de bromocresol reacciona específicamente con la albúmina sérica a un pH de 4.0, dando un complejo colorido de intensidad proporcional a la concentración de albúmina.

PROCEDIMIENTO:

- 1.- Colocar 4 ml. de agua destilada en una celdilla para espectrofotómetro.
- 2.- Agregar 0.01 ml. de suero problema.
- 3.- Agregar 1 ml. de reactivo de Verde de bromocresol.
- 4.- Leer a 630 nm. Ajustando a 100% T con blanco de reactivos.

VALORES DE REFERENCIA: 3.6 - 5.0 gr%.

GLOBULINAS = PROTEINAS TOTALES - ALBUMINA.

ANEXO No. 3

FAGOCITOSIS DE PARTICULAS DE LATEX.

Obtención de la muestra:

Obtener por punción venosa 4 ml. de sangre de los pacientes y del grupo testigo.

Desfibrinar por agitación suave con 10 perlas de vidrio - de 5 mm. de diámetro durante 10 minutos.

Obtención de leucocitos polimorfonucleares:

Con el objeto de obtenerlos libres de eritrocitos, - emplear la técnica de adherencia al vidrio.

- Utilizar cubreobjetos perfectamente desengrasados de 22 x 22 mm.
- Depositar 0.7 ml. de sangre desfibrinada sobre cada cubreobjetos.
- Incubar a 37 °C por 45 minutos en cámara húmeda.
- Lavar con solución de Hanks para eliminar las células no adherentes y suero.

Prueba de fagocitosis de partículas de látex.

- Colocar los polimorfonucleares adheridos a los cubreobjetos, aún húmedos del lavado en cámara húmeda.
- Inmediatamente cubrir con 0.5 ml. de suero autólogo y 50 l de una suspensión de partículas de látex de concentración 1×10^9 por ml.
- Incubar nuevamente los cubreobjetos a 37 °C por 30 minutos.
- Al término de la incubación enjuagar los cubreobjetos con solución de Hanks, para retirar el suero y -

Las partículas de látex no fagocitadas.

- Dejar escurrir y secar al aire.

TINCION:

Teñir las preparaciones con colorante de Wright (siguiendo el mismo procedimiento utilizado en la tinción de frotis sanguíneos)

Montar invertidos sobre portaobjetos.

LECTURA DE LAS PREPARACIONES.

Leer al microscopio con objetivo 100X utilizando aceite de inmersión y contar 100 células polimorfonucleares, para obtener el porcentaje de células fagocíticas así como el promedio de partículas fagocitadas por polimorfonuclear.

CALCULO DEL INDICE FAGOCITICO.

El índice fagocítico se obtiene con la siguiente fórmula: $I.F = (\overline{P.F}) (\% C.F.)$

donde I.F. = Índice fagocítico

$\overline{P.F.}$ = Promedio de partículas fagocitadas por polimorfonuclear.

$\%C.F.$ = Porcentaje de células fagocíticas.

ANEXO No. 4.

DETERMINACION DEL GAMMAGRAMA HEPATO-ESPLENICO.

Técnica utilizada en el estudio gammagráfico:

Se realiza un estudio de perfusión hepática.

- Colocar al paciente en decúbito dorsal (posición del cuerpo en estado de reposo sobre un plano horizontal) debajo del detector de una Cámara de Anger Modelo -- Scintiview Siemens con colimador de alta resolución para Tecnecio 99^m .
- Inyectar por vía endovenosa 5 mCi de Tc^{99m} en forma de coloide de azufre.
- Tomar imágenes estáticas a 500,000 c.p.m en proyección anterior.
- Tomar áreas irregulares en las imágenes estáticas a través del contorno de bazo e hígado, respectivamente.
- Obtener el valor en cuentas por minuto de las áreas irregulares tomadas, por medio del cual se calcula el índice de captación en Bazo/hígado.

ANEXO No. 5.

PREPARACION DE REACTIVOS.

DILUYENTE DE DRABKIN. (Para determinación de hemoglobina)

Ferricianuro de potasio	200 mg.
Cianuro de potasio	50 mg.
Bicarbonato de sodio	1 gr.

Disolver y aforar a un litro con agua destilada.
 Conservar en frasco ámbar (32).

LIQUIDO DE TURK (Diluyente para leucocitos).

Acido acético glacial	2 ml.
Solución acuosa de violeta de genciana	1 ml.

Aforar a 100 ml. con agua destilada (32).

COLORANTE DE WRIGHT.

Colorante de Wright	0.1 gr
Metanol q.p.	60 ml.

Triturar el colorante en un mortero añadiendo poco a poco el metanol, hasta que se alcance el volumen total y todo el colorante se haya disuelto. Una vez preparado debe filtrarse. Dejarlo madurar y filtrarse antes de su uso (32)

SOLUCION AMORTIGUADORA DE FOSFATOS. (pH = 6.4).

Se utiliza para el colorante de Wright.
 Fosfato monopotásico anhidro 6.53 gr.
 Fosfato disódico anhidro 2.56 gr.

Disolver y aforar a un litro con agua destilada.

OXALATO DE AMONIO AL 1% (DILUYENTE PARA PLAQUETAS).

Disolver un gramo de Oxalato de amonio en 100 ml. de agua destilada.

Agregar unas de merthiolate.

Filtrar y conservar en el refrigerador a 4 °C.

Filtrar antes de su uso (32).

DIAZO BLANCO Y DIAZO REACTIVO.

Utilizados para la determinación de bilirrubinas.

DIAZO BLANCO.

Acido clorhídrico q.p. 15 ml.

Agua destilada c.b.p. 1000 ml.

Mezclar, aforar y titular.

REACTIVO DIAZO A.

Acido sulfanílico q.p. 1 gr.

Acido clorhídrico q.p. 15 ml.

Agua destilada c.b.p. 1000 ml.

Disolver el ácido sulfanílico, añadir el ácido clorhídrico y aforar.

REACTIVO DIAZO B.

Nitrito de sodio q.p. 50 gr.

Agua destilada c.b.p. 100 ml.

Disolver y aforar.

DIAZO REACTIVO DE EHRLICH.

Diazo A 10 ml.

Diazo B diluido 0.3 ml.

Diazo B diluido: 0.1 ml de diazo B más 9.9 ml de agua destilada.

Preparar éste reactivo al momento de usarse. (33)

REACTIVOS EMPLEADOS EN LA DETERMINACION DE :

TRANSAMINASA GLUTAMICO OXALACETICA

TRANSAMINASA GLUTAMICO PIRUVICA.

SUSTRATO PARA TGO.

Acido alfa-cetoglutarico q.p.	0.292 gr.
Acido DL-aspartico q.p.	26.6 gr.
Hidróxido de Sodio 1 N	200 ml.
Buffer de fosfato 0.1 M pH=7.4	
c.b.p.	1000 ml.

Disolver las sustancias en el NaOH 1 N.

Ajustar el pH y aforar.

SUSTRATO PARA TGP.

Acido alfa-cetoglutarico q.p.	0.292 gr.
DL-alanina. q.p.	17.8 gr.
Agua destilada	200 ml.
Buffer de fosfato pH=7.4 c.b.p.	1000 ml.

Disolver las sustancias en el agua destilada.

Ajustar el pH y aforar.

SOLUCION AMORTIGUADORA DE FOSFATOS 0.1 M pH=7.4

Solución (A) fosfato disódico q.p.	14.2 gr.
Agua destilada c.b.p.	1000 ml.

Disolver y aforar.

Solución (B) fosfato monopotásico q.p. 13.60 gr.
 Agua destilada c.b.p. 1000 ml.

Mezclar 840 ml. de la solución "A" y 160 ml de la solución "B", si es necesario , ajustar el pH a 7.4.

SOLUCION DE 2,4 DINITRO-FENIL-HIDRACINA.

2,4 dinitro-fenil-hidracina q.p. 0.198 gr.
 Acido clorhídrico 1 N c.b.p. 1000 ml.

Disolver y aforar. (33)

REACTIVO DE BIURET. (PARA DETERMINACION DE PROTEINAS).

Sulfato de cobre 1.5 gr.
 Tartrato de sodio y potasio 6.0 gr
 Yoduro de potasio 1.0 gr.
 Agua destilada c.b.p. 1000 ml.

En un matraz volumétrico de 1000 ml. colocar el sulfato de cobre y el tartrato de sodio y potasio, agregar aproximadamente 500 ml. de agua destilada y agitar hasta disolución; agregar con agitación constante 300 ml. de hidróxido de sodio 2.5 N y mezclar. Añadir el yoduro de potasio y agitar hasta disolución.

Aforar a un litro y conservar en frasco ámbar. (33)

REACTIVO DE VERDE DE BROMOCRESOL.

(PARA DETERMINACION DE ALBUMINA)

Hidróxido de sodio al 10% 26 ml.
 Verde de bromocresol 500 mg.
 Acido láctico 30 ml.
 Tween 20 9.6 ml.
 Agua destilada c.b.p. 900 ml.
 Disolver y ajustar pH a 4.0,
 aforar a 1000 ml.

SOLUCION DE HANKS.

Empleada en la determinación del Índice fagocítico.

Cloruro de calcio	0.14 g
Cloruro de sodio	8.0 g
Cloruro de potasio	0.4 g
Sulfato de magnesio	0.2 g
Fosfato diácido de K	0.06 g
Fosfato monosódico	0.24 g
Glucosa	1.0 g
Cloruro de magnesio	0.2 g
Rojo de fenol	0.02 g
Agua destilada c.b.p.	1000 ml.

Disolver, ajustar pH a 7.45 y aforar.

Conservar en refrigeración.

C A P I T U L O V I I I

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

- 1.- Farreras, V.P. Medicina Interna. 1a ed. Ed. Marín. Mé-
xico, D.F. 1978.
- 2.- Harrison. Principios de Medicina Interna. 6a. ed. Ed.
McGraw-Hill. México, D.F. 1983.
- 3.- Anthony, P.P. , Ishak, K.G. y cols. "The morphology
of cirrhosis". J. Clin. Pathol. 31, 395-414 (1978).
- 4.- Cecil-Loeb. Tratado de Medicina Interna. 11a ed. Ed.
Interamericana. México, D.F. 1985.
- 5.- Sherlock, S. "The portal venous system and portal hy-
pertension". Blackwell Scientific Publication. 6a. ed.
1981.
- 6.- Bellanti, J.A. Inmunología. 2a. ed. Ed. Interamericana
México, D.F. 1984.
- 7.- Gómez-Estrada, H. , Limas, E. y cols. "Fagocitosis en
pacientes esplenectomizados". Arch. Inv. Med. 6 [1] ,
33-40 (1975).
- 8.- Fudenberg, H.H. , Stites, D.F. Inmunología Básica y -
Clínica. 4a ed. Ed. El Manual Moderno. México, D.F. -
1983.
- 9.- Stossel, T.P. "Phagocytosis". New. Engl. J. Med. 290
[13] , 717-723 (1974).
- 10.- Bach, J.F. Inmunología. 1a. ed. Ed. Limusa. México, -
D.F. 1984.
- 11.- Rogoff, T.M. , Lipsky, P.E. "Role of the Kupffer Cell
in Local and Systemic Immune Responses". Gastroente-
rology. 80, 854-860.(1981).
- 12.- Territo, M.C. , Gline, M.J. "Monocyte function in man"
J. Immunology. 118 [1] , 187-192 (1977).

- 13.- Stossel, T.P. "Phagocytosis". New. Engl. J. Med. 290 [14] , 774-780 (1977).
- 14.- DeMeo, A.M. , Andersen, B.R. "Defective chemotaxis - associated with a serum inhibitor in cirrhotic patients". New. Engl. J. Med. 286 [14] , 735-740 (1972)
- 15.- Maderazo, F.C. , Ward, P.A. "Defective regulation of chemotaxis in cirrhosis". J. Lab. Clin. Med. 85 [4] , 621-630 (1975).
- 16.- Cambell, A.C. y cols. "Neutrophil function in chronic liver disease". Clin. exp. Immunol. 45, 81-89 (1981).
- 17.- Wozniak, K.J. , Silverman, E.M. "Granulocyte adherence in chronic alcoholism". Am. J. Clin. Pathol. 71 - [3] , 269-272 (1979).
- 18.- MacGregor, R.R. , Macorac, E.J. "Comparative adherence of granulocytes to endothelial monolayers and nylon - fibres". J. Clin. Invest. 61, 697-702 (1978).
- 19.- Altin, M. , Rajkovic, I.A. y cols. "Neutrophil adherence in chronic liver disease and fulminant hepatic failure" Gut. 24, 746-750 (1983).
- 20.- Hassner, A. , Kletter, Y. y cols. "Impaired monocyte function in liver cirrhosis". Br. Med. J. 282, 1262-1263 (1981).
- 21.- Lahnborg, G. , Friman, L. "Reticuloendothelial function in patients with alcoholic liver cirrhosis". -- Scand. J. Gastroenterology. 16, 481-489 (1981).
- 22.- Rimola, A. , Soto, R. y cols. "Reticuloendothelial -- System Phagocytic Activity in Cirrhosis and Its Relation to Bacterial Infections and Prognosis". Hepatology. 4 [1] , 53-58 (1984).
- 23.- Hoefs, J.C. , Canawati, H.N. y cols. "Spontaneous Bacterial Peritonitis" Hepatology. 2 [4] , 339-407 (1982)

- 24.- García-Tsao, G. , Con, H.O. "The diagnosis of bacterial peritonitis: Comparison of pH, Lactate Concentration and Leukocyte Count". Hepatology. 5 [1] , -- 91-96 (1985).
- 25.- Gitlin, N. , Stauffer, J.L. "The pH of ascitic fluid in the diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis in alcoholic cirrhosis". Hepatology. 2 [4] , 408-411 (1982).
- 26.- Runyon, B.A. , Van Epps, D.E. "Diuresis of cirrhotic Ascitis Increases Its Opsonic Activity and May Help Prevent Spontaneous Bacterial Peritonitis". Hepatology. 6 [3] , 396-399 (1986).
- 27.- Kronborg, I.J. , Knopf, P.M. y cols. "Intrahepatic -- synthesis of immunoglobulin in liver disease" Liver - 2, 385-392 (1982).
- 28.- Pomier-Layrargues, G. , Huet, P.M. y cols. "Hyperglobulinemia in Alcoholic Cirrhosis" Dig Dis Sci. 25 [7], 489-493 (1980).
- 29.- Kleinman, R.E. , Harmatz, P.R. "The Liver: An Integral Part of the Enteric Mucosal Immune System". Hepatology 2 [3] , 379-384 (1982).
- 30.- Hodges, J.R. , Wright, R. "Normal immune responses in the gut and liver". Clin Sci. 63, 339-347 (1982).
- 31.- Gourgoutis, G.D. , Das, G. "Splenic Uptake of ^{99m}Tech- netium Sulphur Colloid as in Index of Portal Hyperten sion". Amer. J. Gastroenterol. 57 [5] ,435-442 (1972)
- 32.- Davidshon, I. Diagnóstico Clínico por el Laboratorio. 6a ed. Salvat Editores. México, D.F. 1982.
- 33.- I.M.S.S. Subdirección General Médica. Laboratorio Clí- nico. Procedimientos. México 1978.
- 34.- Portilla, E.C. Estadística. 1a ed. Ed. Interamericana. México, D.F. 1984.