



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

PREPARACION DE UN PATRON PRIMARIO DE HEMOGLOBINA

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

MERCEDES TRIGUEROS GAISMAN

1 9 7 7



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.



LAB. 1977
DE [REDACTED]
ACHA
ADOC 391

2

JURADO ASIGNADO SEGUN EL TEMA :

PRESIDENTE : FERNANDO VELEZ OROZCO;

VOCAL: SALVADOR MARTIN SOSA.

SECRETARIO: JOSEFINA PIEDRAS.

1er.SUPLENTE: MA.ELENA BUSTAMANTE C.

2o.SUPLENTE: ESTHER GUTIERREZ:

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

LABORATORIO DE BIOQUIMICA DEL HOSPITAL DEL NIÑO D.I.F.

SUSTENTANTE: MERCEDES TRIGUEROS GAISMAN:

ASESOR DEL TEMA: SALVADOR MARTIN SOSA.

SUPERVISOR TECNICO: CARLOS ZAMAYOA.

I - INTRODUCCION.

La cuantificación de la hemoglobina en sangre total, (hemoglobinometría) ha recibido una gran atención de numerosos investigadores en problemas hematológicos de la serie roja y, de manera muy particular, desde que se generalizó el uso de equipos automatizados. El mejoramiento de la exactitud y precisión de la cuantificación de la hemoglobina, resultó de la aplicación del método de la cianometahemoglobina, propuesto originalmente por Stadie en forma de un método fotométrico muy sencillo. Posteriormente Drabkin (16) - introdujo algunos cambios en el reactivo y de esta manera logró reducir la turbidez que se producía frecuentemente. Mas adelante, Van Kampen y Zilstra (15) lograron reducir el tiempo de reacción a 4-5 minutos, mediante el uso de un reactivo estable por un tiempo relativamente largo.

El método tal como se realiza en la actualidad, tiene características satisfactorias, por lo que toca a reproducibilidad y a precisión. En el aspecto exactitud, también se ha requerido de una gran cantidad de trabajo de laboratorio, para llegar a un método de aceptación internacional, pero desde 1967 la Asamblea de Comités de Estandarización, del Comité Internacional para la Estandarización en Hematología, dió su aprobación para el uso del patrón primario de cianometahemoglobina para la hemoglobinometría.

Debido a la gran importancia de la exactitud en estas mediciones y a la conveniencia de que un laboratorio de hematología disponga permanentemente de un patrón primario adecuado, se consideró de utilidad práctica realizar este trabajo, que ha permitido la preparación de un pequeño lote de patrón primario de hemoglobina y la determinación de su concentración por un método de exactitud reconocida, como lo es la cuantificación del ión férrico de la hemoglobina.

II - GENERALIDADES SOBRE HEMOGLOBINOCLOGIA.

Hasta 1956, en los albores de la hemoglobiología moderna, existían dos teorías principales para explicar el desarrollo de las células sanguíneas. La teoría Monofilética exponía que todas las células provenían de un hemohistioblasto que se consideraba totipotente. La teoría Polifilética consideraba que los primeros precursores de las células sanguíneas, los más primitivos que podían encontrarse, ya estaban formando parte de una familia celular de maduración o desarrollo específico. Actualmente, se estima que las células medulares pueden provenir de un progenitor reticuloendotelial común, que correspondería al hemohistioblasto de la literatura antigua.

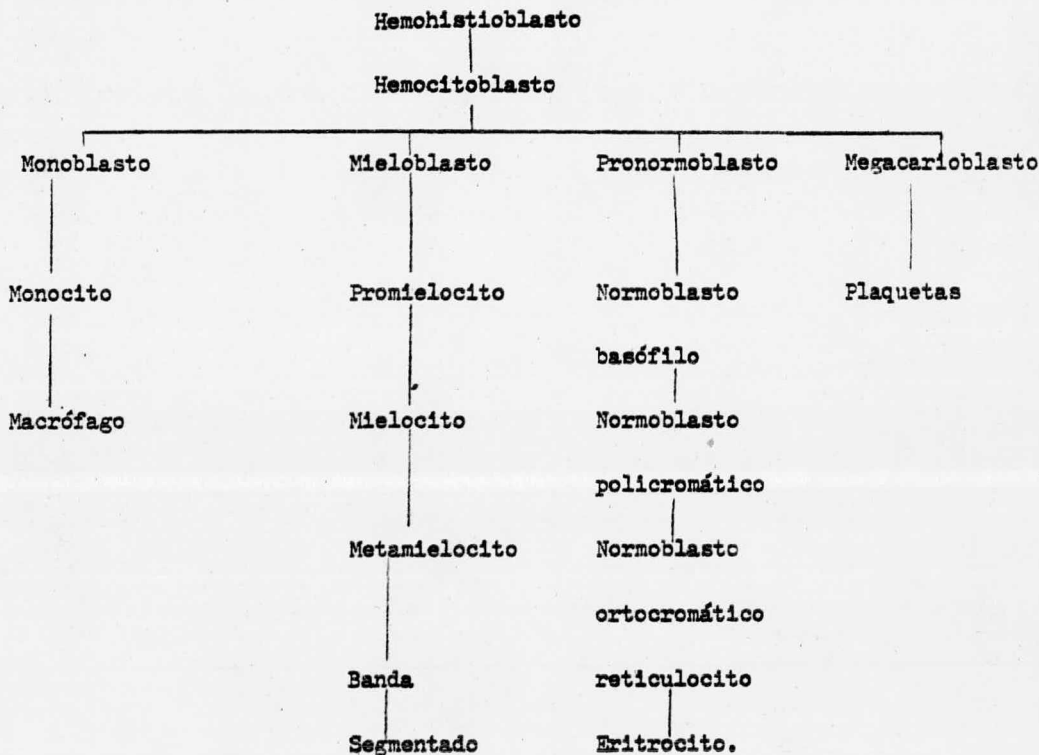
La célula reticuloendotelial primitiva (hemohistioblasto) es una célula grande que va a dar origen al hemocitoblasto que se encuentra en médula ósea, ganglios linfáticos, bazo e hígado. Algunas de estas células muestran ciertas características de la serie de células que van a originar.

Los factores que regulan el paso de las células de médula a sangre se conocen mal. Además de células rojas o eritrocitos, se encuentran en la sangre glóbulos blancos de diversas características y funciones, como son los granulocitos, linfocitos, monocitos y megacariocitos.

En el embrión, las células de la sangre, excepto los linfo

cidos, provienen del tejido conjuntivo embionario (mesénquima).

FIGURA 1.



Las primeras células son eritroblastos primitivos en los islotes sanguíneos del saco vitelino, pero en el segundo mes de desarrollo el hígado ya se ha vuelto hematopoyético y han aparecido leucocitos de serie granulocítica. En el cuarto mes la médula ósea se -

vuelve el centro mas importante de producción de células sanguíneas. La médula ósea que se encuentra en las cavidades de todos los huesos puede adoptar dos variedades: la médula amarilla, o médula ósea inactiva y la médula roja activa, que produce células de las series: mieloide, eritroide y megacariocítica.

El pronormoblasto o proeritroblasto es una célula de mediano tamaño, semejante al mieloblasto. Su núcleo suele verse bien y muestra un anillo delgado de citoplasma homogéneo y de color azul obscuro. En el normoblasto basófilo el núcleo presenta una red gruesa de cromatina, cuando disminuye de tamaño y aparecen los primeros indicios de hemoglobina cerca del núcleo, se le llama normoblasto poli-cromatófilo. Al seguirse formando hemoglobina el citoplasma adquiere un color cobre mate y es llamado normoblasto ortocromático, en éste el núcleo se encoje para formar una masa densa y regular que finalmente es expulsada del citoplasma.

El reticulocito es un glóbulo rojo joven, que contiene una red de material basófilo que puede teñirse con azul brillante de cresilo y madura en 2 a 4 días; su abundancia en la circulación periférica es un índice de actividad eritropoyética, considerándose normal la presencia de 0.5 a 1.5 % de reticulocitos en sangre periférica.

(Ver la Figura 1).

El eritrocito maduro se forma cuando el reticulocito pierde su material basófilo, dando origen a un eritrocito intensamente acidófilo (eosinófilo); es un disco circular, bicóncavo, sin núcleo, que posee una membrana compleja de lípidos y proteínas con una arquitectura parecida a la de una esponja que contiene hemoglobina. En personas adultas la cifra normal de eritrocitos (por mm^3 de sangre) es de 4.8 millones en mujeres y de 5.4 millones en hombres . (9)

El componente mas importante del eritrocito es la hemoglobina. Esta es una hemoproteína cuya parte proteica se llama globina, incolora y constituida de cuatro cadenas peptídicas que forman asas complicadas; la otra porción se llama heme.

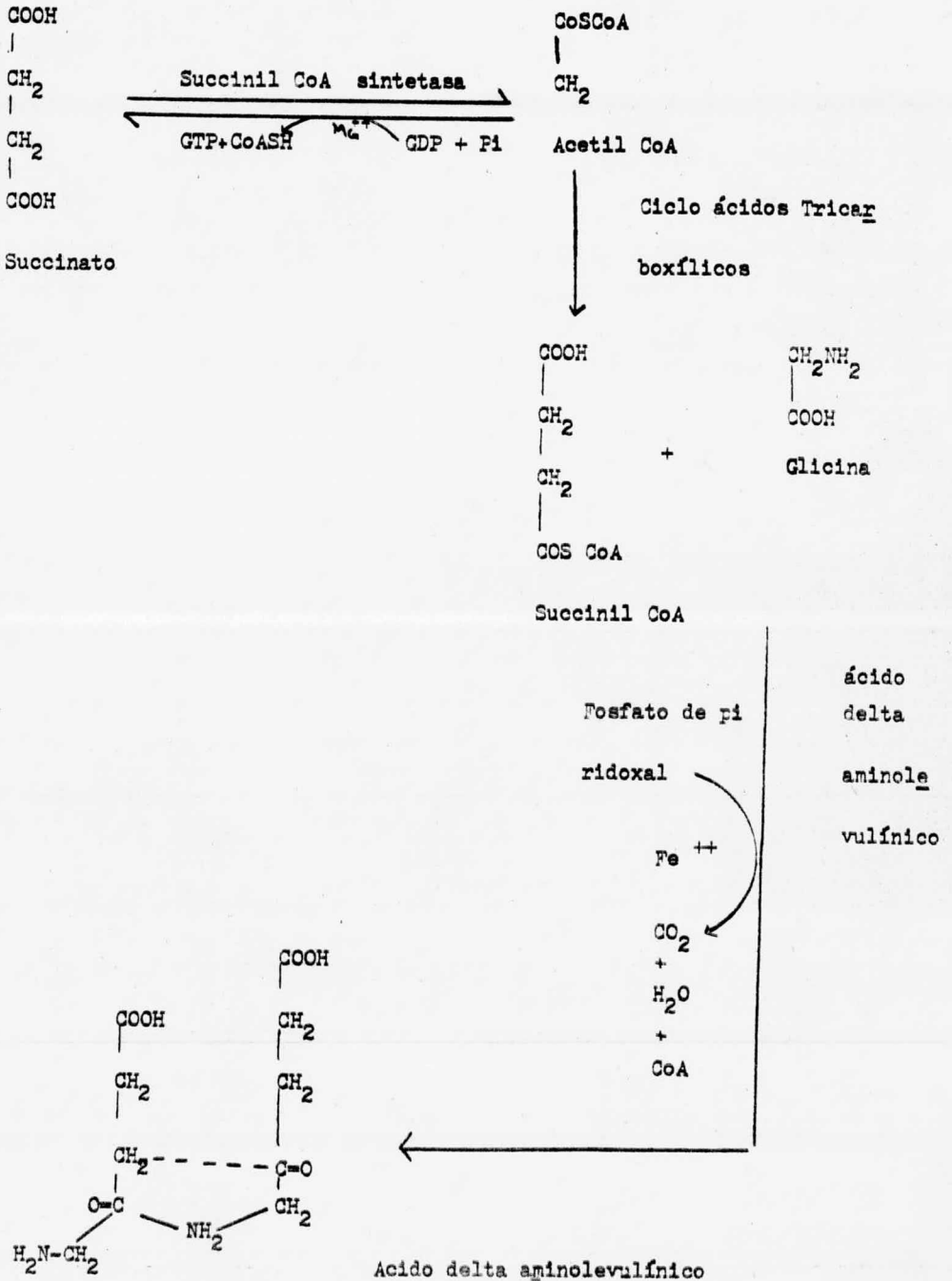
La hemoglobina normal del adulto (Hb A), cuyo peso molecular es de 68,000 tiene dos pares de cadenas alfa y dos pares de cadenas beta. Cada cadena alfa posee 141 aminoácidos en un orden conocido. Empieza con valina y termina con arginina. La cadena beta posee 146 aminoácidos (con valina en un extremo e histidina en el otro). En el adulto existe una pequeña proporción de hemoglobina fetal (Hb F) en la cual las cadenas beta son substituidas por cadenas gamma que tienen diferentes sucesión de aminoácidos y ello hace que su movilidad electroforética sea diferente y su resistencia a los álcalis sea bastante mas alta que la de la hemoglobina normal. La cantidad de Hb F

es normalmente mas alta en la infancia que en la edad adulta y aumenta en ciertos estados patológicos. (10)

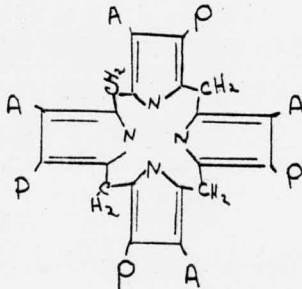
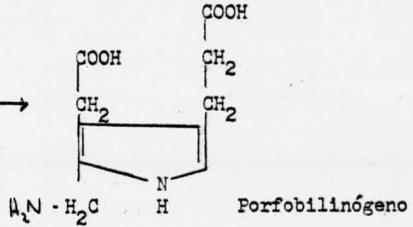
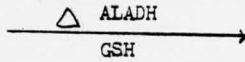
Otro componente secundario de la hemoglobina del adulto es la Hb A₂, en la cual las cadenas beta son substituídas por cadenas delta. Si el orden de los aminoácidos en la cadena peptídica difiere de las variedades alfa y beta habituales, o si deja de formarse una cadena o se produce una recombinación anómala, se producen hemoglobinas anormales. Existe otra variedad, todavía mal conocida, pero distinta de las mencionadas, en la que las cadenas peptídicas adoptan una -disposición helicoidal, lo que dá a la molécula una estructura esferoide. (9).

Un eritrocito humano contiene 280 millones de moléculas de hemoglobina. Cada molécula contiene 64,500 veces el peso del átomo de hidrógeno y está hecha de alrededor de 10,000 átomos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno y azufre, y cuatro átomos de fierro. Cada átomo de fierro se encuentra en el centro de los grupos de átomos que forman el heme, lo que le dá color a la sangre y capacidad para combinarse con el oxígeno. El heme es una porfirina del fierro y su molécula es un producto final del metabolismo de las porfirinas (figura 2), durante el cual se construye la complicada estructura a partir de sustancias relativamente simples.

FIGURA 2.



Acido delta amino
levulínico



Porfobilinógeno

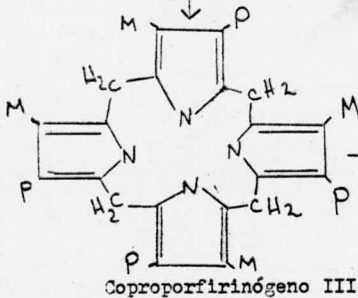
deaminasa.

Uroporfirinógeno

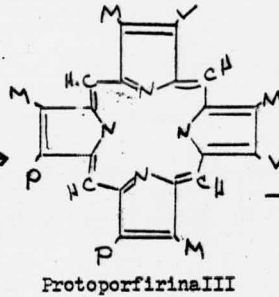
isomerasa.

Uroporfirinógeno

Uroporfirinógeno decarboxilasa



Coproporfirinógeno oxida
dasa



+ Fe

+ Globina

HEMOGLOBINA.

M = Metil (-CH₃)

P = Acido Propiónico (-CH₂CH₂COOH)

V = Vinil (-CH=CH₂)

A = Acido Acético (-CH₂COOH)

(16)

El primer precursor del heme, el ácido delta aminolevulínico, se forma por la condensación de dos aminoácidos: glicina y succinil Coenzima A (este último puede ser formado por diferentes vías: el ciclo de ácidos tricarbóxicos ó ciclo de Krebs es generalmente su precursor, aunque también puede formarse al reaccionar el succinato con Co A y guanosin trifosfato en presencia de succinil CoA sintetasa).

La condensación de glicina con succinil CoA se lleva a cabo en presencia de la sintetasa del ácido delta aminolevulínico (ALA). El nivel de esta enzima, que es muy importante, se controla por la inducción y represión de la síntesis de enzimas, las hormonas sexuales y sus derivados pueden inducir las; las dietas a base de glucosa y altos carbohidratos bloquean la inducción de la enzima. El heme, producto final de esta síntesis, reprime la síntesis de la ALA sintetasa.

La síntesis de ALA requiere la participación de dos vitaminas, piridoxina, en forma de fosfato de piridoxal y ácido pantoténico. El fierro es un cofactor en la reacción.

En la siguiente etapa, dos moléculas de ALA se unen en presencia de la enzima dehidrasa delta aminolevulínica para formar porfobilinógeno, un monopirrol que tiene cadenas de ácido acético y ácido propiónico. La enzima requiere grupos sulfhidrilo para activarse, se inhibe con plomo y se estabiliza con glutatión.

Ⓢ Cuatro moléculas de porfobilinógeno se condensan para formar uroporfirinógeno, la reacción necesita de dos enzimas, la sintetasa de uroporfirinógeno y la cosintetasa de uroporfirinógeno III.

Se forma el coproporfirinógeno III a partir del uroporfirinógeno por decarboxilación de cuatro cadenas de ácido acético. Esta reacción es catalizada por la enzima uroporfirinógeno decarboxilasa. La conversión de coproporfirinógeno III a protoporfirina requiere de una enzima mitocondrial llamada coproporfirinógeno oxidasa. En tejidos de mamíferos y en bacterias aerobias la reacción necesita de oxígeno molecular.

La última etapa de la síntesis del heme es catalizada por una enzima llamada hemesintetasa, donde el hierro en su estado ferroso es insertado en el anillo porfirínico. (16)

Cada grupo heme es envuelto por una de las cuatro cadenas de aminoácidos que constituyen la globina. El enlace entre heme y la cadena polipeptídica se debe a la histidina, cuyo grupo imidazol desempeña un papel muy importante en la amortiguación iónica. El pliegue de las cuatro cadenas de hemoglobina hace que se cierre igual que una cadena de mioglobina, proteína transportadora de oxígeno en el músculo, cuya estructura ha sido dilucidada en detalle. La correlación

de las estructuras de las dos proteínas nos permite especificar por métodos físicos donde se encuentra cada aminoácido respecto al enroscamiento de cada cadena. Es obvio que el análisis de la hemoglobina por Rayos X es mucho mas complicado que el de la mioglobina, puesto que la primera es cuatro veces mayor y posee cuatro veces mas átomos capaces de producir difracción. (11)

Tanto las cadenas alfa como las beta poseen una estructura alfa helicoidal, como ocurre con las cadenas de la mioglobina. Las cadenas alfa y beta son muy semejantes en su estructura terciaria, y se acoplan en configuración tetraédrica característica.

La hemoglobina es el componente de los eritrocitos que a través de las arterias transporta oxígeno desde los pulmones hasta los tejidos, y a través de las venas ayuda a llevar CO_2 a los pulmones. En ausencia de este transportados de oxígeno, un litro de sangre arterial a la temperatura del cuerpo puede transportar no mas de tres mililitros de oxígeno. La presencia de la hemoglobina, incrementa esta capacidad setenta veces. Al llevar a cabo esta actividad química la hemoglobina sufre un cambio estructural: dos de estas cuatro cadenas se alternan entre ellas, se adelgazan cuando la molécula de oxígeno se une a la hemoglobina y se ensanchan cuando el oxígeno es liberado. Cada uno de los cuatro átomos de hierro puede ser

ocupado por una molécula de oxígeno. La reacción es reversible en el sentido de que el oxígeno entra cuando hay exceso de O_2 , como ocurre en el pulmón y sale cuando hay carencia, como ocurre en las células de los tejidos. La reacción va acompañada de un cambio de coloración: la hemoglobina que oxígeno (oxihemoglobina) hace que la sangre arterial se vea rojo escarlata, reducida, libre de O_2 , hace que la sangre venosa se vea purpúrea. (3)

El fierro (Fe^{+2}), adquiere su capacidad de ligarse a una molécula de oxígeno solamente a través de su combinación con heme y globina. El heme solo no puede ligarse al O_2 , pero el medio químico específico de la globina hace que la combinación sea posible. La función de la globina va mas allá, pues hace posible que los cuatro átomos de Fe dentro de la molécula interaccionen de una manera fisiológicamente ventajosa. (11) La hemoglobina juega un papel muy importante en la tolerancia al CO_2 formado por los tejidos y regresado a los pulmones. Cuando el CO_2 entra al eritrocito es convertido a ácido carbónico (H_2CO_3), por acción de la enzima anhidrasa carbónica. Esto causa incremento de la concentración de H^+ .

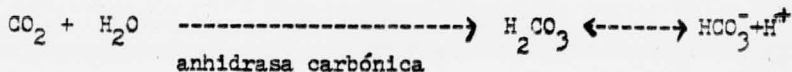


FIGURA 3

EVENTOS EN EL ERITROCITO CUANDO LA SANGRE ARTERIAL LLEGA A LOS TEJIDOS DE INTERCAMBIO DE OXIGENO:

Tejidos de intercambio de oxígeno	Plasma	Eritrocito	Plasma	Tejidos de intercambio de oxígeno
CO_2		$\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow[\text{anhidrasa carbónica}]{\text{anhidrasa carbónica}} \text{H}_2\text{CO}_3$ $\text{H}_2\text{CO}_3 \rightleftharpoons \text{H} + \text{HCO}_3^-$ $\text{H} + \text{HbO}_2 \rightarrow \text{HHbO}_2 \rightarrow \text{HHb} + \text{O}_2$	$\text{Cl}^- \leftarrow \text{Cl}^-$ $\text{HCO}_3^- \rightarrow \text{HCO}_3^-$	O_2

EVENTOS EN EL ERITROCITO CUANDO LA SANGRE VENOSA LLEGA A LOS PULMONES.

Pulmones	Plasma	Eritrocito	Plasma	Pulmones
O_2		$\text{O}_2 + \text{HbO}_2 \rightleftharpoons \text{HbO}_2$ $\text{HCO}_3^- + \text{HHbO}_2 \rightleftharpoons \text{HbO}_2 + \text{H}_2\text{CO}_3$		
	Cl^-	Cl^-		
		$\text{H}_2\text{CO}_3 \rightarrow \text{H} + \text{CO}_2$		CO_2

La disociación de la hemoglobina oxigenada a hemoglobina desoxigenada y oxígeno es favorecida por la presencia de H^+ , que decrece la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno.



El H^+ generado del H_2CO_3 tiende a ligarse a la hemoglobina oxigenada formando $HHbO_2$ que reduce la afinidad por el oxígeno y la disocia a la forma ácida de hemoglobina desoxigenada (HHb), liberando el oxígeno. El oxígeno sale de la célula para entrar a los tejidos. El CO_2 es transportado por la sangre venosa en el plasma como HCO_3^- . Para prevenir un desajuste del medio iónico el Cl^- entra del plasma al eritrocito.

Cuando la sangre venosa llega a los pulmones, sale el Cl^- y entra O_2 y HCO_3^- . Por la acción de una anhidrasa carbónica el H_2CO_3 es convertido a CO_2 y H_2O . El CO_2 se difunde en el plasma y entra a los pulmones. (ver la Figura 3) (3)

La hemoglobina no solo es responsable del transporte de oxígeno sino que también es un amortiguador, puesto que al producirse H^+ del H_2CO_3 el pH de la sangre venosa decrece, pero muy poco. Existe otro sistema amortiguador secundario en la sangre; el de fosfatos en sangre no es suficiente como para acomodar todo el H^+ producido.

III - CONCEPTOS SOBRE CONTROL DE CALIDAD

APLICADOS A ANALISIS CLINICOS:

El control de calidad se apoya en un sistema estadístico que permite determinar la reproducibilidad o grado de precisión de los procedimientos empleados. Este sistema no mide exactitud de una determinación, pero sí toma en cuenta todas las variables inherentes a una determinación, en nuestro caso:

- a) Reproducibilidad del método y condiciones de los reactivos.
- b) Pericia de la persona que efectúa el ensayo.
- c) Limpieza del material de vidrio.
- d) Exactitud de los dispositivos de medición.
- e) Método utilizado para calcular resultados.

Todas estas variables pueden afectar el grado de precisión de una determinación, en particular en el trabajo de rutina. (6)

Se consigue un control de calidad correcto tomando en cuenta dos elementos: exactitud y precisión.

Exactitud significa la medida correcta de una cantidad y representa la aproximación del resultado obtenido en una serie de determinaciones al valor real de una muestra, permite detectar errores sistemáticos y depende siempre de un factor específico; como cuando se emplean pipetas mal calibradas o cuando se deseca una sal inadecuadamente y con ella se prepara un patrón de una concentración determinada. (5)

Al efectuar el control de calidad, el problema reside principalmente en la dificultad de disponer de soluciones de referencia adecuadas. Como se sabe, es realmente difícil precisar que significan los valores reales o efectivos. Por otro lado, estos valores asignados con mayor o menor exactitud dependen, desde luego, de una serie de factores que son válidos exclusivamente para el método y condiciones en los que se llevaron a cabo todas y cada una de las determinaciones.

El patrón primario indispensable para lograr esta exactitud, es una solución de un producto químico que se supone está absolutamente correcto en cuanto a su concentración e identidad. En los últimos pasos de la técnica se compara la muestra con el color producido por, o el título de valoración de un patrón puro como base para calcular la concentración de un componente de la muestra. (6)

Precisión es la reproducibilidad de una serie de valores obtenidos, empleando un método determinado con reactivos específicos y en condiciones constantes. Un Método preciso no necesariamente es exacto. En la práctica, es difícil saber qué valor debe ser considerado como real. Por lo general, cuando se va a llevar a cabo un programa de control de calidad, se seleccionan los sueros control, que pueden existir ya en el mercado con el único problema de que su pre-

cio es elevado y de que algunas veces estos sueros control no expresan los valores para el método que se está utilizando. (12)

El "Valor Normal" (que en lo sucesivo será denominado "Valor de Referencia", llamándole así porque varía según las circunstancias del paciente) de un componente bioquímico presente en líquidos, secreciones y excreciones de un organismo es aquel que se observa en la mayoría de los individuos de una población que pudiera considerarse normal, en determinadas condiciones, de tal manera que un "Valor Normal" para un individuo puede NO SERLO para otro, aunque éste sea considerado normal en las condiciones particulares en que vive. Para establecer los límites de "Referencia" se utiliza un análisis estadístico de datos obtenidos de un número determinado de individuos considerados "normales". (6) En nuestro caso, los valores de referencia de la hemoglobina serán:

En hombres adultos entre 13 y 18 g/100ml y 11 - 16 g/100ml en mujeres adultas. (16)

Existen algunas variables a estos valores, entre los que encontramos:

Edad: Al nacer el niño tiene entre 14 y 23 g/100 ml; alrededor del mes de nacido este valor baja y lo encontramos entre 12 y 16 g/100ml;

al cumplir un año aproximadamente, el valor baja un poco mas: 10 - 14 g/100ml; después de los dos años hay un incremento gradual hasta llegar a los valores del adulto, que se alcanzan en la adolescencia.

Raza: No hay diferencia entre caucásicos, negros y orientales.

Ejercicio: Existe un incremento del valor de referencia debido al ejercicio, del 3 - 10 % por decremento de volumen sanguíneo.

Altitud: Se ha establecido que individuos que viven a gran altitud tienen elevados sus valores normales por la baja tensión de O_2 . Los rangos en mujeres y hombres son los siguientes: 15.5 - 21.7 y 17.3-24 g/100ml, respectivamente . (16)

Postura: Se ha demostrado que la hemoglobina baja un 7% en personas que han estado acostadas un período relativamente largo, sin embargo existen otros autores que niegan este decremento. (6)

Temperatura : Cuando hay cambios en el volumen sanguíneo, la concentración de la hemoglobina decrece, en un medio ambiente caliente y se incrementa en uno frío, pero no hay ningún cambio en la cantidad de hemoglobina total circulante. (16)

Es necesario que cada laboratorio tenga un patrón primario y un suero control para poder llevar a cabo un control de calidad -

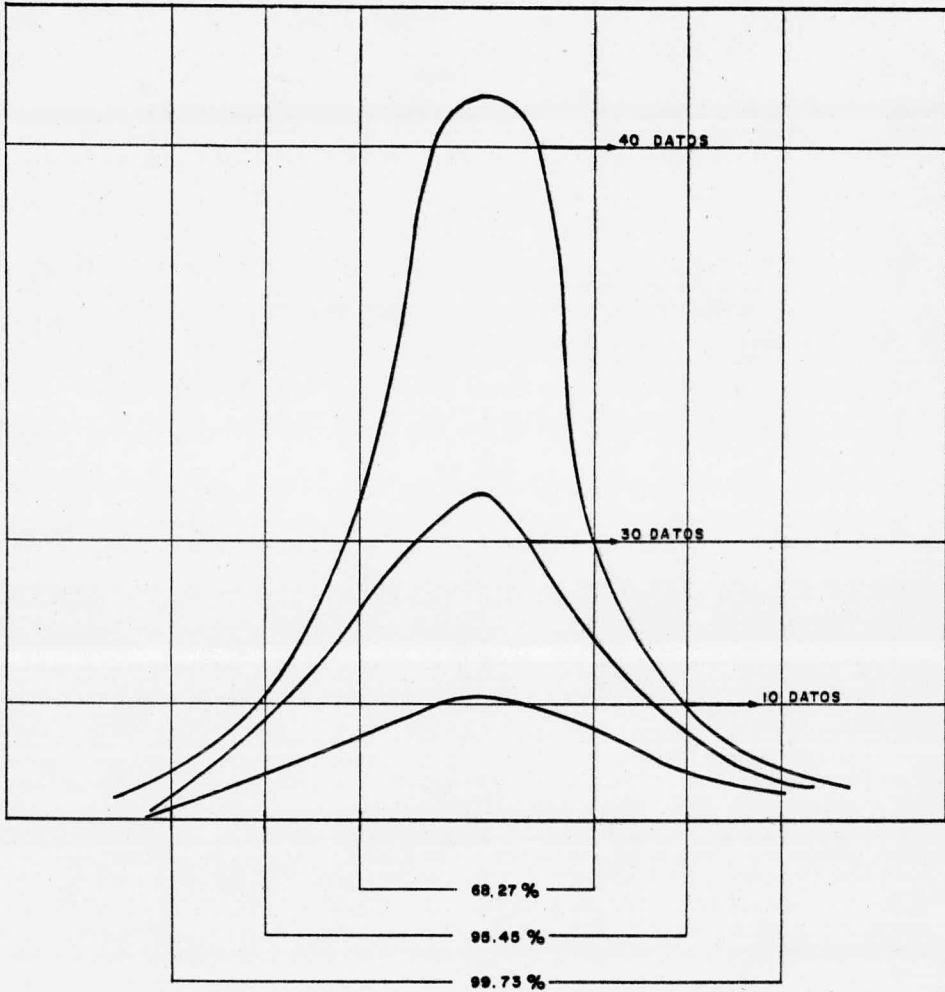
mas adecuado y exacto. De esta manera se podrá obtener una mayor seguridad en el resultado que se está reportando. (12)

Un suero control simula la composición química y las características de la muestra que se está analizando; el suero control pasa a través de los diferentes pasos de la técnica y, durante todo el proceso, está sujeto a los mismos errores sistemáticos, debidos al azar, que la muestra problema. El valor del suero control incluido junto a cualquier grupo de muestras problema, se calcula respecto a los valores de los patrones, de igual forma que son calculadas las muestras problema. El valor así obtenido para el suero control se compara con el valor del patrón. Se dirá que la prueba está dentro o fuera de control según el grado de concordancia observado entre el valor calculado y el valor del patrón.

A fin de establecer un intervalo de variación permisible, es necesario primero determinar la desviación estandard.

La desviación estandard es la medida matemática de dispersión de los valores respecto al valor medio o valor promedio. Se obtiene la diferencia, con respecto al valor medio, de los valores obtenidos, se eleva al cuadrado y se suman todos los cuadrados. Este total se divide por el número de determinaciones menos una, y la raíz cuadrada de este valor se toma como desviación estandard.

21
FIGURA 4



$$D.E = \sqrt{\frac{\sum (\bar{X} - X_i)^2}{n - 1}}$$

D.E. = Desviación Estandard.

\bar{X} = Media Aritmética.

X = Valores Individuales.

n = Número de Valores.

Es necesario conocer el coeficiente de variación (C.V), pues to que indica la variación en forma de porcentaje y se puede calcular de la siguiente manera:

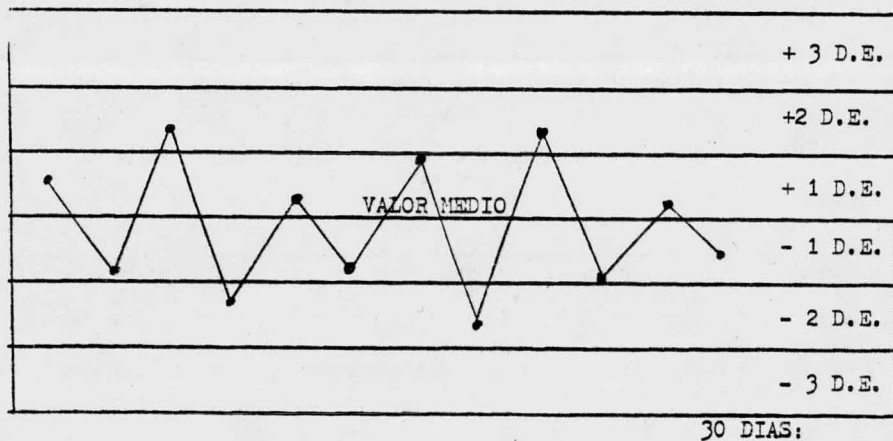
$$C.V. = \frac{D.E.}{\bar{X}} \times 100 \quad (11)$$

Por lo general, se considera un mínimo de 30 pruebas para obtener un valor aceptable. Si se ilustra esta desviación estandard en una curva de Gauss, podremos observar como un número menor de pruebas hará que la desviación estandard se incremente y un número mayor, de 30 a 50 hará que decrezca hasta hacerse relativamente pequeña. (Fig 4).

Después de calculada la desviación estandard, estos valores pueden ser expresados gráficamente para preparar una "gráfica de control de calidad" . Esta se usa para registrar los valores diarios obtenidos para el suero control. (Fig.5)

Una vez preparada la gráfica de control de calidad, las determinaciones futuras, usando el control conocido, deberán caer dentro de ± 2 desviaciones estandard. Cuando los valores caen dentro de este intervalo, ello indica que el procedimiento está funcionando normalmente y los valores están dentro de los límites de confianza o intervalo de variación admisible. (5)

FIGURA 5



Es importante que el control de calidad para la determinación de hemoglobina se lleve a cabo con sumo cuidado, ya que existen enfermedades en las que los valores de ésta se encuentran en límites cercanos al valor de referencia. (2) En un paciente anémico, su hemoglobina, eritrocitos y hematocrito muestran cifras inferiores a las normales. La capacidad de transporte de oxígeno de su sangre está reducida y hay un cambio en el volumen total de sangre.

Por razones prácticas los estándares de hemoglobina se han preparado desde el punto de vista de la exactitud; por lo tanto, el problema radica en cuantificar la cifra de hemoglobina presente en el material de referencia.

Aunque es uno de los procedimientos más útiles en clínica médica, la medición de la hemoglobina fué poco satisfactoria durante muchos años. Esto se debió a una proposición introducida por Hayem a comienzos del siglo, quien sugirió expresar la hemoglobina en porcentaje. Para implantar dicha proposición, los fabricantes de hemoglobinómetros eligieron en forma arbitraria una amplia gama de valores equivalentes a 100% en un instrumento y a 81 % en otro. Posteriormente la comisión internacional para la estandarización de he-

hemoglobina estableció 64,458 como su peso molecular y 0.34% su contenido de hierro y recomendó una solución de cianometahemoglobina de concentración conocida, como patrón internacional, (7) con lo cual quedó corregida la anomalía.

Existe una amplia gama de instrumentos para medir la hemoglobina; desde la escala Tallqvist, inexacta e imprecisa, ideada en 1900, que consiste en una serie de colores litográficos, que representan los valores de hemoglobina en grados del 10 al 100 % y en que la sangre sin diluir, recogida en un trozo de papel absorbente, se comparaba con los colores de la escala, el margen de error era del 20 al 50%, hasta los aparatos espectrofotométricos muy costosos, pero capaces de alcanzar elevada precisión.

Entre los hemoglobinómetros figura el de Sahli, relativamente barato, en el cual la sangre recogida con una pipeta, se diluye con una solución de ácido clorhídrico, comparándose el color de la mezcla resultante con un patrón. Un poco más costoso pero más fáciles de usar son los instrumentos dotados de una fuente luminosa fija que no requiere que se diluya la sangre. Además, están los espectrofotómetros que son de dos tipos: los fotómetros de filtro y los espectrofotómetros. En los primeros se hace pasar luz blanca por filtros para

obtener luz de una gama de longitud de onda que coincida con la región del espectro que la solución colorida absorbe mas. Esta luz filtrada pasa por un determinado espesor de la solución y el porcentaje de luz filtrada que la solución transmite, se capta en una celda fotoeléctrica y se registra con un galvanómetro; la concentración de la sustancia colorida es proporcional a la densidad óptica. En el espectrofotómetro se hace pasar una estrecha banda de luz de determinada longitud de onda, a través de la solución de concentración desconocida y se mide la absorción de luz; dicha concentración se calcula por comparación con la absorbancia de una solución estándar de concentración conocida.

Los procedimientos para medir la hemoglobina se clasifican en cuatro grupos:

1.- Colorimétricos.- Por medios visuales o fotoeléctricos:

- a) Oxihemoglobina : La sangre se diluye con agua y se compara a simple vista con una solución patrón de picrocarmin. Se han diseñado instrumentos mas modernos como el hemoglobinómetro de Spencer.
- b) Hematina ácida; (Sahli 1895) .- Se diluye la sangre con HCl 0.1N para que se convierta en hematina ácida parda. Esta se diluye con agua y se compara con el patrón de vidrio pardo.

c) Cianometahemoglobina.- Se explicará cuidadosamente en el siguiente capítulo.

2.- Métodos Gasométricos: En ellos se determina la capacidad de oxigenación de la sangre.

El procedimiento para el empleo de éstos métodos es muy costoso, pero se llega a un 99.5% de exactitud. Solo se mide la hemoglobina funcional y los valores resultan un 2 % mas bajos que los determinados por el método de cuantificación del hierro en la hemoglobina.

3.- Densidad de la Sangre : Muy poco utilizado y poco confiable.

4.- Métodos Químicos : Como el método del hierro, será explicado en el próximo capítulo. (2)

IV - MATERIAL Y METODOS.

Un grupo de investigadores ingleses que incluye a Bartholomew, Sisson, Donaldson y King (6) , encontró que las técnicas que daban resultados con errores menores al 3% eran:

- a) Dosificación de hierro de la hemoglobina.
- b) Método de oxihemoglobina.
- c) Método de cianometahemoglobina.

La determinación de cianometahemoglobina en sangre total ha sido considerada como la técnica mas exacta para la determinación directa de hemoglobina en sangre y por eso es recomendada por el Comité Internacional para la Estandarización en Hematología (ICSH):

- a) Los laboratorios clínicos pueden usar el método de cianometahemoglobina exclusivamente para la determinación de hemoglobina en sangre.
- b) El término gramos (de hemoglobina) por 100ml (de sangre) debe ser usado para expresar la concentración de hemoglobina.
- c) Para determinaciones rutinarias diarias, debe usarse como estandard una solución estéril de cianometahemoglobina 60 - 85 mg/100ml preparada y probada de acuerdo a condiciones específicas.

El hecho de que la cianometahemoglobina sea el único derivado de la hemoglobina cuya estabilidad es de un año o mayor, la ha convertido en el material de referencia preferido para la determina-

ción fotométrica de la hemoglobina. Además, sus propiedades especiales hacen que el método de cianometahemoglobina sea suficientemente exacto y digno de confianza, aún en el caso de utilizar fotómetros sencillos de filtro. El espectro de absorción de la cianometahemoglobina exhibe un máximo alrededor de los 540 nm, por lo que es fácil conseguir un filtro que permita obtener una banda especial en la región de absorción máxima.

La solución de cianometahemoglobina obedece a la ley de Beer, puesto que el diluyente tiene una absorbancia a esta longitud de onda debe ser usada como cero y puede obtenerse una línea de calibración con solo ir adicionando diferentes cantidades del estandard. Otra ventaja de este método es que todos los derivados comunes de la hemoglobina pueden ser convertidos rápidamente a cianometahemoglobina. Esto elimina los errores debidos a la presencia simultánea de diferentes derivados de la hemoglobina.

Sin embargo, este patrón tiene también sus desventajas (bajo condiciones normales), se requieren algunos minutos para la formación de la cianometahemoglobina y si hay carboxihemoglobina presente la lectura no deberá hacerse sino hasta después de 90 minutos a temperatura ambiente. También la presencia de restos de eritrocitos, si

por algún motivo no hubo hemólisis completa, puede causar cierto grado de turbidez

DETERMINACION DE HEMOGLOBINA EN SANGRE POR EL METODO
DE CIANOMETAHEMOGLOBINA.

PRINCIPIO:

El ión ferroso del heme de la hemoglobina, oxihemoglobina y carboxihemoglobina es oxidado al estado férrico por el ferricianuro, formando la metahemoglobina; ésta se combina con iones cianuro para producir la cianometahemoglobina estable que se mide fotométricamente a 540 nm. El pH de este reactivo ha sido reducido para acelerar la reacción, y se le ha añadido detergente para prevenir la turbidez - que podría presentarse al bajar el pH.

REACTIVOS:

Solucion de Drabkin:

Disolver 200 mg de $K_3Fe(CN)_6$, 50 mg de KCN y 140 mg de KH_2PO_4 en 900 mililitros de agua. Añadir 0.5 ml de STEROX -SE y mezclar cuidadosa-

mente hasta que se disuelva. Ajustar el pH a 7.2 ± 1 con H_3PO_4 0.1N o con KOH 0.1N y diluir a un litro con agua destilada. Esta solución es estable por varios meses si se guarda en un frasco ámbar en refrigeración.

PATRON: 60 mg/100ml .- Se obtiene sangre humana fresca y se agregan 2 ml de citrato de sodio al 3.2% por cada 10 ml de sangre. Se centrifuga y se decanta el plasma. Los eritrocitos se lavan dos veces con solución salina al 0.9% y dos veces con solución salina al 1.2%. A un volumen de células lavadas se le agrega un volumen igual de clorofor_{mo} (grado analítico). Se mezcla con cuidado y se deja 12 horas a $4^{\circ}C$; luego se centrifuga a alta velocidad durante 30 minutos. La capa superior acuosa que contiene la hemoglobinas_e transfiere a un frasco limpio, filtrándose a través de un papel filtro y se determina su concentración por el método de cianometahemoglobina y por el método de fierro. Se diluye con solución de Drabkin hasta obtener una concentración de hemoglobina de 60mg/100ml.

Después se esteriliza por filtración a través de un filtro Seitz y se coloca asépticamente en frascos ámbar de 10 ml, los que son sellados con tapones de hule. Su pureza se verifica examinando el espectro de absorción entre 450 y 504 nm, la cual debe de ser entre 1.58 y 1.62. La turbidez se verifica observando por el fenómeno de

Tyndall.

Los patrones que contienen 50% de glicerol parecen ser menos susceptibles al crecimiento bacteriano. Si se usan así, deben leerse contra blancos que contengan 50% de glicerol.

Los patrones de hemoglobina son estables por lo menos durante un año en la obscuridad y a temperatura ambiente, pero no deben congelarse. (6) La desviación estándar de la absorbancia del patrón de cianometahemoglobina ha sido calculada en 1% del valor establecido, con base a pruebas realizadas en 40 laboratorios clínicos. (13)

Procedimiento para cuantificar la hemoglobina por el método de cianometahemoglobina.

1.- Medir 5.0 ml de reactivo de hemoglobina en un tubo de ensaye, agregar 0.020 ml de sangre bien mezclada con anticoagulante. Con una pipeta tipo Sahli o similar. Dicha pipeta debe ser del tipo TC (to - contain de modo que después de llenarla hasta la marca , se requiere limpiar la parte exterior de ella con un papel absorbente o algodón y enjuagar su contenido tres veces en el diluyente. Después se mezcla.

2.- Reposar los tubos 5 minutos cuando menos. Medir absorbancia contra blanco de reactivo de hemoglobina a 540 nm, o usando el filtro a-

propiado para la longitud de onda.

CALCULOS:

Para espectrofotómetro: 540nm, cubetas de 1.0 cm de paso de luz y considerando un coeficiente de extinción milimolar de 11.0 mg-átomo de Fe (55.85 mg) por litro.:

$$\text{g Hb} / 100\text{ml} = A_{540} \times 36.8$$

Para fotómetros de filtro:

$$\text{g Hb}/100\text{ml} = A_{540} \times F$$

donde $F = \frac{\text{gHb}/100\text{ml} \text{ (del patrón)}}{A_{540} \text{ (del patrón)}}$ (6)

NOTAS:

1.- En estudios anteriores se había obtenido el valor de 11.5 para el coeficiente de extinción milimolar de la cianometahemoglobina; últimamente ha sido cambiado a 11.0 por evidencia experimental abrumadora y este valor es ya aceptado en general.

La confiabilidad de los cálculos de concentración de hemoglobina depende de la confiabilidad de las lecturas de absorbancia en cualquier espectrofotómetro.

2.- Al pH del reactivo de hemoglobina se necesitan menos de 5 minutos para completar la conversión de hemoglobina a cianometahemoglobina. El color del patrón es estable por un período de 9 a 12 meses cuando menos, siempre que se conserve al abrigo de la luz. (15)

3.- En la calibración de las pipetas tipo Sahli manufacturadas por varias empresas, se ha demostrado que solo aproximadamente 2/3 de ellas tienen un error menor de 1-3 % y alrededor del 6% de ellas tienen un error mayor del 5%. Es por ello conveniente verificar la calibración de las pipetas que se vayan a usar.

DETERMINACION DE HEMOGLOBINA SANGUINEA POR EL

METODO DE FIERRO.

PRINCIPIO:

La sangre es digerida con una mezcla de ácidos: H_2SO_4, HNO_3 . Así, el fierro sale del complejo heme y se oxida a Fe^{+3} . Una parte de este fierro se precipita como $Fe_2(SO_4)_3$, por lo cual se añade HCl para tener el Fe en la solución.

El pH se ajusta a 4 - 5 y se añade hidroquinona para reducir el Fe^{+3} y, el color desarrollado por la ortofenantrolina se mide a 510nm.

REACTIVOS:

- H_2SO_4 conc. grado analítico.
- HNO_3 conc. grado analítico.

- HClO_4 70% grado analítico.
 - HCl conc. grado analítico.
 - HClO_4 - HNO_3 , mezclar volumen a volumen antes de usarlo.
 - Acetato de Amonio al 50% en agua destilada.
 - Hidroquinona al 1% en agua destilada. Preparar cantidades pequeñas (10ml) diariamente, según el número de pruebas.
 - O-fenantrolina al 0.2% en agua destilada. Es estable en refrigeración hasta por un año.
 - Patrón de fierro, 100 mg/100 ml; Limpiar una pieza de alambre de hierro puro (cuando menos 99.8 % de Fe) con HCl 6N y luego con agua. Secar. Pesar 100 mg de alambre limpio en un matraz erlemeyer de 250 ml, añadir 10 ml de HNO_3 conc y 40 ml de agua destilada. Calentar ligeramente hasta disolución completa. Enfriar y pasar cuantitativamente a un matraz volumétrico de 100 ml. Aforar y mezclar perfectamente. Es estable hasta por un año cuando menos.
 - Patrón de fierro, de trabajo, 1 mg/100ml. Diluir 1 ml del patrón de fierro con 99 ml de agua destilada. Preparar fresco diariamente.
- CUIDADO DEL MATERIAL: Este debe ser lavado con HCl caliente, diluido volumen a volumen con agua y enjuagado con agua.

El agua destilada simple es satisfactoria para la preparación de los reactivos y para la prueba misma.

PROCEDIMIENTO:

- 1.- Poner 1 ml de sangre bien mezclada en el fondo de un matraz de Kjeldahl de 100 ml. Poner 1 ml de agua en otro matraz igual para que sirva de blanco.
- 2.- Añadir cuidadosamente 3.0 ml de H_2SO_4 conc y 4 ml de HNO_3 conc. Calentar hasta que se lleve a cabo la digestión y el contenido del matraz tome un color café.
- 3.- Añadir 2 ml de mezcla $HClO_4-HNO_3$ a cada matraz y calentar hasta que aparezcan humos de SO_3 (el añadir estos ácidos en mezcla es mejor que cada uno por separado, pues se evita una reacción violenta). El contenido tomará un color amarillo pálido y posiblemente se observe un precipitado de $Fe_2(SO_4)_3$.
- 4.- Enfriar, añadir 20 ml de agua y calentar otra vez hasta la aparición de humos.
- 5.- Añadir 2 ml de HCl conc. y hervir 25 segundos. (Si se hierve más se pierde HCl y se precipita el $Fe_2(SO_4)_3$)
- 6.- Añadir 20 ml de agua, calentar a ebullición, enfriar a temperatura ambiente.
- 7.- Añadir acetato de amonio al 50% a obtener un pH 4.2 - 4.4 o ajustar con HCl diluido si es necesario.
- 8.- Aforar a 100 ml con agua destilada.

9.- Pasar a tubos aforados a 10 ml en la siguiente forma:

Blanco: 4 ml del blanco digerido.

Estandar: 4 ml del blanco digerido + 2 ml del patrón de trabajo.

Desconocido: 4 ml de la dilución de sangre digerida.

10.- Añadir acetato de amonio al 50%, para ajustar el pH a 4.2 - 4.4.

11.--Añadir un ml de hidroquinona al 1 %, mezclar y agregar 2 ml de solución de ortofenantrolina, aforar con agua a 10 ml y mezclar perfectamente.

12.- Esperar aproximadamente 60 minutos las absorbancias contra agua a 510 nm.

CALCULOS:

$$\text{mg Fe/100 ml} = \frac{A_x - A_b}{A_s - A_b} \times 0.02 \times \frac{100}{4} \times 100$$

$$\text{g Hb/100 ml} = \frac{\text{mg Fe/100 ml}}{347}$$

Donde: A_x = Absorbancia del problema.

A_b = Absorbancia del blanco.

A_s = Absorbancia del estandar.

(6)

V - RESULTADOS.

Se preparó un lote de 100 ampolletas con 10 ml de patrón primario de hemoglobina, se conservaran entre 4 y 7°C.

Se hicieron 30 determinaciones de hierro en diferentes ampollas del patrón primario. Los valores correspondientes de hemoglobina aparecen en la Tabla 1, así como los mg de hierro y los valores calculados de: $(X - \bar{X})$ y de $(X - \bar{X})^2$.

El valor promedio fué de 59.55 que se refiere a la concentración de la hemoglobina en mg/100 ml en el patrón primario.

El cálculo de la desviación estandard se llevó a cabo de la siguiente forma:

$$D.E. = \sqrt{\frac{\sum (X - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

$$D.E. = 0.64163$$

Se obtuvo también el coeficiente de variabilidad :

$$C.V. = \frac{D.E.}{\bar{X}}$$

$$C.V. = 1.0774 \%$$

$$59.55 \pm 1 D.E. \quad \left\langle \begin{array}{l} 58.90 \\ 60.19 \end{array} \right. \text{ límites.}$$

$$59.55 \pm 2 D.E. = \left\langle \begin{array}{l} 60.83 \\ 58.26 \end{array} \right. \text{ límites.}$$

$$59.55 \pm 3 \text{ D.E.} = \begin{cases} 61.47 \\ 57.62 \end{cases} \text{ l\u00edmites.}$$

Con los valores obtenidos se grafic\u00f3 una curva de distribuci\u00f3n de frecuencias, que se muestra en la Figura 6. Si bien se observa una desviaci\u00f3n a la derecha, (valores arriba de la media), la curva es del tipo normal o de Gauss, como era de esperarse.

Debido a que se consider\u00f3 que las pruebas 5 y 9 estuvieron fuera de control (mas de 3 D.E.) , se repitieron y los valores observados fueron:

5.- 59.40 mg Hb/100ml.

9.- 59.28 mg Hb/100ml.

El valor conseguido fu\u00e9 el siguiente:

$$\bar{X} = 59.406$$

$$\text{D.E.} = 0.38617$$

$$\text{C.V.} = 0.650$$

No se consider\u00f3 necesario repetir la Tabla 1 con los datos corregidos de las pruebas 5 y 9, pero es evidente el efecto negativo de dos valores fuera de control en la D.E. y C.V.

También se corrió una curva por triplicado con el patrón primario, cuyos resultados aparecen en la Figura 7.

Se verificó la pureza del patrón primario examinando el espectro de absorción entre 450 y 700 nm y los valores obtenidos se graficaron en la Figura 8. También se determinó la relación de absorbancia a 504 y 540, dando 1.60. Como puede verse estos resultados fueron satisfactorios, y en cuanto a los límites de confianza para \bar{X} y D.E., también puede considerarse que fueron excelentes. De acuerdo con Henry, debe esperarse un C.V. de 1 % aproximadamente.

TABLA No. 1

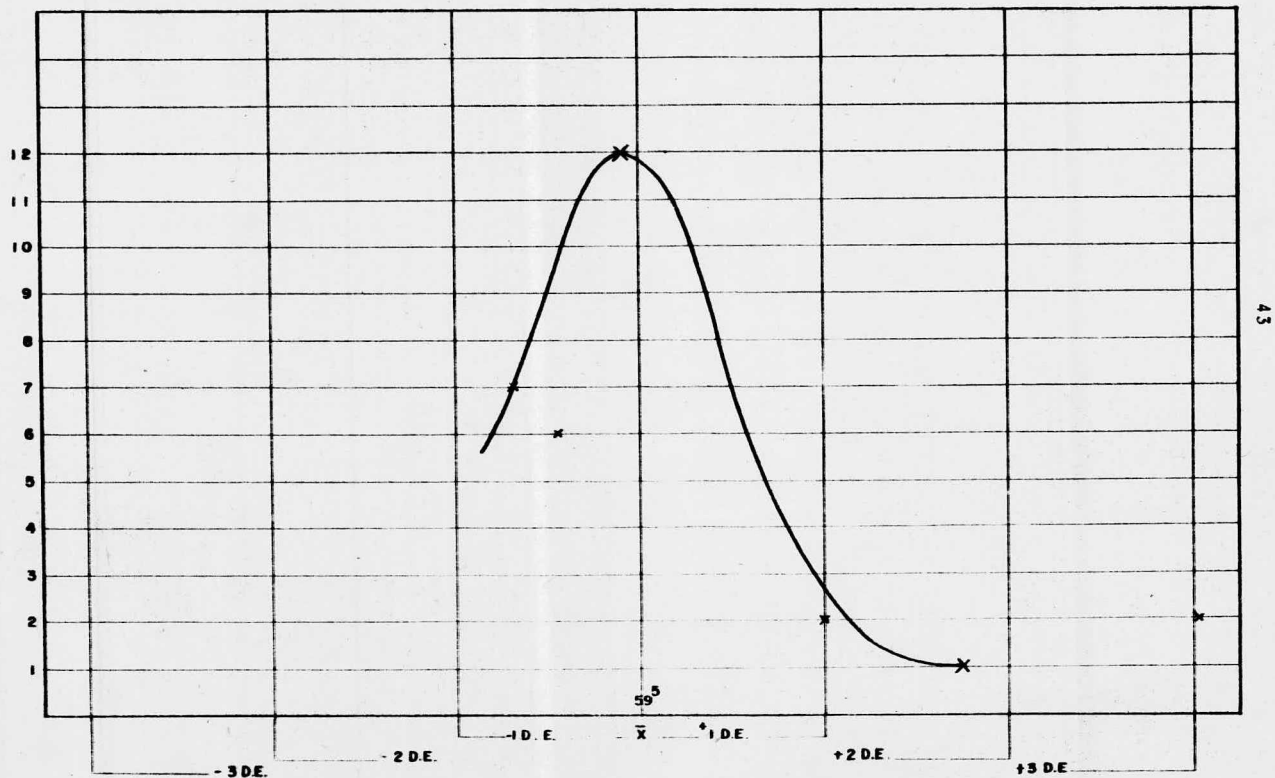
PRUEBAS	mg Fe/100 ml	mg Hb (x)/100 ml	$(x - \bar{x})$	$(x - \bar{x})^2$
1	2.0552	59.23	0.32	0.1024
2	2.1097	60.8	1.25	1.5625
3	2.055	59.23	0.32	0.1024
4	2.055	59.23	0.32	0.1024
5	2.134	61.5	1.95	3.8025
6	2.0511	59.11	0.44	0.1936
7	2.0511	59.11	0.44	0.1936
8	2.0511	59.11	0.44	0.1936
9	2.134	61.5	1.95	3.8025
10	2.0511	59.11	0.44	0.1936
11	2.0604	59.38	0.17	0.0289
12	2.088	60.20	0.65	0.4225
13	2.0604	59.38	0.17	0.0289
14	2.0604	59.38	0.17	0.0289
15	2.0604	59.38	0.17	0.0289

14

CONTINUACION DE LA TABLA No. 1

PRUEBAS	mg Fe/100 ml	mg Hb/100 ml (x)	(x - \bar{x})	(x - \bar{x}) ²
16	2.0889	60.2	0.65	0.4225
17	2.0535	59.18	0.37	0.1369
18	2.0535	59.18	0.37	0.1369
19	2.0535	59.18	0.37	0.1369
20	2.0587	59.33	0.22	0.0484
21	2.0587	59.33	0.22	0.0484
22	2.0587	59.33	0.22	0.0484
23	2.0604	59.38	0.17	0.0289
24	2.0604	59.38	0.17	0.0289
25	2.0604	59.38	0.17	0.0289
26	2.0604	59.38	0.17	0.0289
27	2.0604	59.38	0.17	0.0289
28	2.0629	59.45	0.10	0.010
29	2.0629	59.45	0.10	0.010
30	2.0629	59.45	0.10	0.010

FIGURA 6

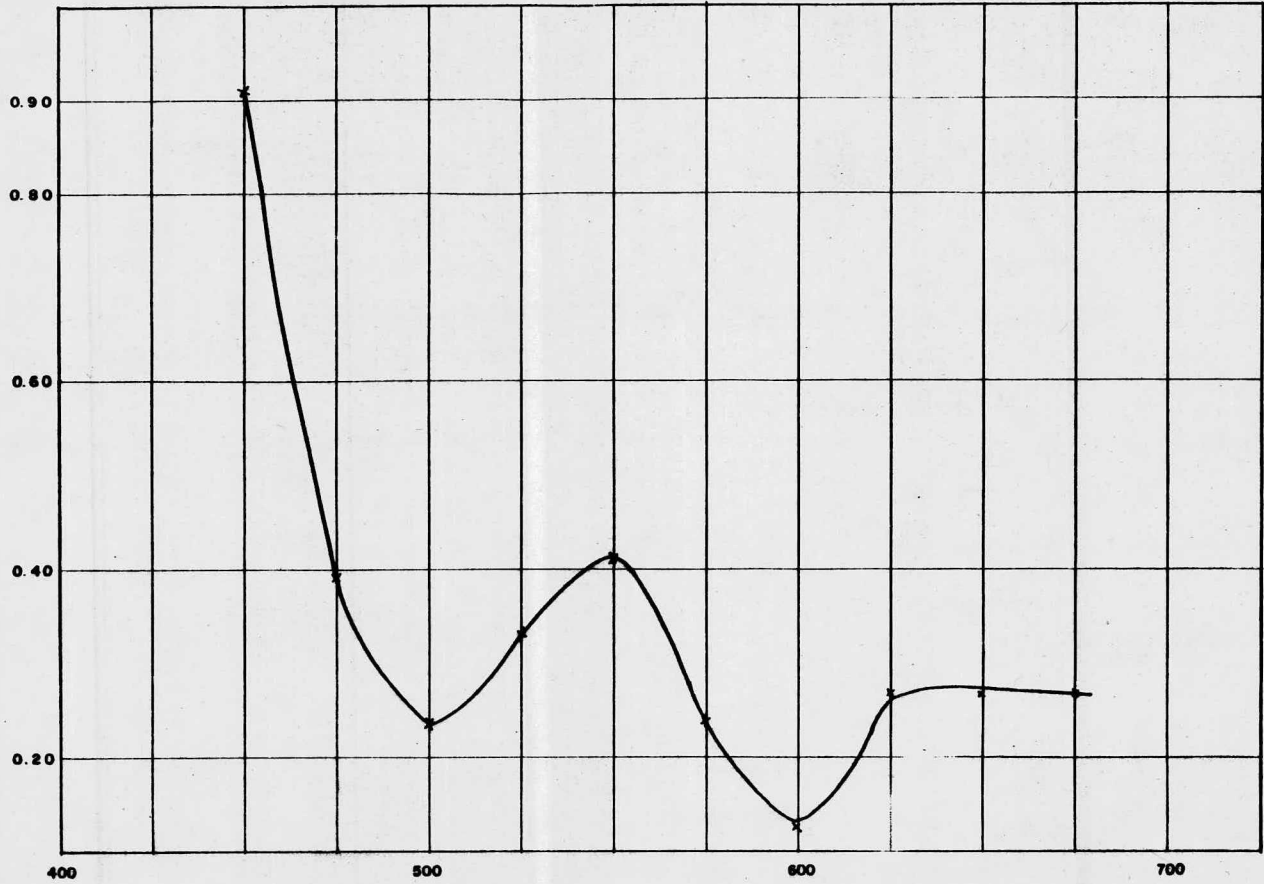


CURVA ESTANDAR PARA HEMOGLOBINA FIGURA 7



FIGURA 8

A



VI - CONCLUSIONES.

El trabajo realizado dió como resultado un patrón primario cuya concentración de hemoglobina fué determinada con la mayor exactitud y precisión, gracias al empleo de un patrón primario de fierro que puede ser considerado como material de referencia y de un método que los expertos consideran particularmente exacto y preciso, como es la cuantificación del ión Fe^{+2} por desarrollo de color con reactivo de ortofenantrolina.

Este material fué evaluado comparativamente en pruebas rutinarias del laboratorio de hematología del Hospital del Niño D.I.F.

De lo anterior sacamos las siguientes conclusiones:

- a) Los resultados fueron muy satisfactorios.
- b) Si bien la preparación y normalización de un patrón de hemoglobina no es tarea sencilla, podría resultar conveniente y económico para laboratorios que lo utilizan constantemente.

VII - BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Actualidades diagnósticas 4 .- Mnheim- Boerhinger .- Farmacéuticos
Lakeside, S.A.- México, 1972.
- 2.- Bacells A.- La Clínica y el Laboratorio .- 8a.ed .- Barcelona,1972.
- 3.- Behinski R.C. .- Modern Concepts in Biochemistry .- Allyn and -
Bacon Inc.- 2a.ed .- Boston, 1973.
- 4.- Conn E.E. Stumpf P.K. .- Outlines of Biochemistry .- Wiley International
Edition .- 2a. ed .- 1966.
- 5.- Derrick F.G. Gresban M.T. .- Practical Charting Techniques in -
Quality Assurance Programs .- Monograph by DADE Education.
- 6.- Henry R.J. Cannon D.C. .- Clinical Gemistry principles and Techniques .-
Bioscience Laboratories .- 2a. ed .- London 1974.
- 7.- Leavell B.S. Thorup O.A. .- Fundamentals of Clinical Hematology.-
W B Saunders Co. Phyladelphia and London .- 2a. ed .- 1968.
- 8.- Lehninger A. I. .- Biochemistry .- Worth Publishers Inc .-
6a ed .- 1972.

- 9.- Lynch M. Raphael S Spare P. Inwood M .- Métodos de Laboratorio .- Editorial Interamericana.- 2a ed. 1972.
- 10.- Perutz M.F. .- The Hemoglobin Molecule .- Readings from Scientific American: Bioorganic Chemistry .- Editorial Freeman .- Nov. 1974.
- 11 .- Servicio Informativ o Merck 18 .- México, 1976.
- 12 .- Simposium sobre Control de Calidad en el Laboratorio de Patología Clínica.- Primer Congreso Latinoamericano de Patología Clínica .- México 1974.
- 13.- Suderman F.W. .- American Journal of Clinical Pathology .- 43:9,1965.
- 14.- Todd - Sanford .- Clinical Diagnosis by Laboratory Methods .- Ed. Saunders .- 14a.ed .- 1975.
- 15 .- Van Kampen E.J. Zijlstra W.G. .- Advances Clinical Chemistry .- 8: 141, 1965.
- 16 .- Wintrobe M.M. .- Hematología Clínica .- Editorial Interamericana.- 3a.ed .- México 1966.

"Jesús Estrella"
521-20-73  526-01-76
BOLIVIA No. 4