

302827

9
24



UNIVERSIDAD MOTOLINIA, A. C.

ESCUELA DE QUIMICA

CON ESTUDIOS INCORPORADOS A LA U.N.A.M.

SEPSIS EN NIÑOS: ALTERACIONES
MORFOLOGICAS DE LAS CELULAS SANGUINEAS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

GARCIA CARDENAS MARIA

TESIS CON MEXICO, D. F.,
FALLA DE ORIGEN

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

**ESTE TRABAJO SE REALIZO EN EL LABORATORIO DE
HEMATOLOGIA CON EL APOYO DE LOS SERVICIOS DE
URGENCIAS Y DE INFECTOLOGIA DEL INSTITUTO
NACIONAL DE PEDIATRIA, BAJO LA DIRECCION DE
LA Q.F.B. LINA ROMERO RAMIREZ Y EL Q.F.B.
QUILLERMO ESCAMILLA HERNANDEZ, QUIMICOS
PERTENECIENTES AL LABORATORIO DE HEMATOLOGIA.**

CON DEDICATORIA A MIS PADRES

**CON GRATITUD A FAMILIARES Y
AMIGOS QUE ME APOYARON.**

**POR SU INAPRECIABLE AYUDA Y
COLABORACION AIDA Y SOCORRO....**

... MIL GRACIAS

GENARO:

**GRACIAS POR TU GRAN APOYO Y
MOTIVACION.**

SON INVALUABLES PARA MI.

POR TI GENARO EDGAR

**LO MAS IMPORTANTE EN LA VIDA
NO ES DARSE JAMAS POR SATISFECHO
DE SI MISMO O DE SU CONOCIMIENTO
O DE LAS PEQUEÑAS VICTORIAS SINO
APUNTAR CADA DIA A NUEVAS METAS Y
MEJORES TRIUNFOS, A VALORES
MAS DURADEROS.**

INDICE

CAPITULO I

INTRODUCCION

| | Pág. |
|--------------------------------|-------------|
| 1.1 Planteamiento del problema | 1 |
| 1.2 Objetivos | 2 |
| 1.3 Hipótesis | 2 |

CAPITULO II

ANTECEDENTES

| | |
|--|----|
| 2.1 Información general sobre el tema. Ontogenia de las células sanguíneas. | 3 |
| 2.1.1 Morfología. | 3 |
| 2.2 Anormalidades. | 7 |
| 2.2.1 Cuenta diferencial. | 8 |
| 2.2.2 Neutropenia. | 9 |
| 2.2.3 Neutrofilia. | 9 |
| 2.2.4 Linfocitosis. | 11 |
| 2.2.5 Linfopenia. | 11 |
| 2.2.6 Monocitosis. | 12 |
| 2.3. Dinámica leucocítica. | 12 |
| 2.3.1 Dinámica del Neutrófilo en sangre. | 13 |
| 2.3.2 Migración de neutrófilos a tejidos. | 13 |
| 2.3.3 Fagocitosis de partículas. | 14 |
| 2.3.4 Función secretora de los neutrófilos. | 19 |
| 2.4 Valores normales y variaciones fisiológicas. | 20 |

| | | |
|-------|---|----|
| 2.4.1 | Variaciones de leucocitos en enfermedades | 21 |
| 2.4.2 | Leucocitos en inflamación. | 21 |
| 2.5 | Rasgos morfológicos de los neutrófilos en septicemia. | 23 |

CAPITULO III PARTE EXPERIMENTAL

| | | |
|-------|-------------------------------|----|
| 3.1 | Diagrama de flujo. | 24 |
| 3.2 | Material, reactivos y equipo. | 25 |
| 3.2.1 | Material biológico. | 25 |
| 3.2.2 | Material laboratorio | 25 |
| 3.2.3 | Reactivos. | 25 |
| 3.2.4 | Equipo. | 25 |
| 3.3 | Metodología. | 26 |
| 3.3.1 | Toma de muestra. | 26 |
| 3.3.2 | Técnica. | 26 |
| 3.3.3 | Tinción de Wright. | 26 |
| 3.3.4 | Cuenta diferencial | 27 |

CAPITULO IV RESULTADOS Y DISCUSION

| | | |
|-----|-------------|----|
| 4.1 | Resultados. | 29 |
| 4.2 | Discusión. | 32 |

CAPITULO V CONCLUSIONES 34

BIBLIOGRAFIA 35

APENDICE 38

CAPITULO I

INTRODUCCION

I.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En la práctica pediátrica a veces es difícil establecer el diagnóstico de infección en niños y generalmente esto se acentúa en el período neonatal.

Como un apoyo muy útil para el diagnóstico de infección, la cuenta de leucocitos en sangre periférica y la cuenta diferencial de los mismos, han sido usados en los pasados 75 años. (1)

Se han determinado diversos patrones de cambios hematológicos asociados con cuadros de sepsis, como son:

a) **Variaciones en la cuenta de neutrófilos.**

Una adecuada cantidad de neutrófilos es un importante factor en la resistencia del huésped a la infección. Si la cantidad de neutrófilos disminuye la probabilidad de una infección es mayor; a esto se le conoce como neutropenia, lo cual está asociado con la elevación de mortalidad de niños con sepsis.

b) **Relación formas en banda - cuenta de leucocitos.**

Se ha reportado que niños recién nacidos con infección bacteriana tuvieron cuentas de neutrófilos normales, sin embargo, la cantidad de formas en banda se incrementa por arriba del rango normal.

La desviación a la izquierda (predominio de formas jóvenes) de los leucocitos se usa como ayuda en el diagnóstico temprano de infección bacteriana. (2)

c) **Cambios degenerativos en los neutrófilos.**

Los neutrófilos de pacientes con infección bacteriana, frecuentemente muestran cambios morfológicos como picnosis, granulaciones tóxicas y vacuolización.

En apoyo al diagnóstico de septicemia, es de gran importancia entre otros la biometría hemática, mediante la cual es posible obtener la cuenta de leucocitos, enumerar neutrófilos totales, así como la observación de cambios en los rasgos morfológicos de los neutrófilos. (3)

1.2 OBJETIVOS.

- **Determinar si la presencia de vacuolización, granulaciones tóxicas y cuerpos de Döhle sirve de apoyo al diagnóstico de septicemia.**
- **Confirmar que la biometría hemática apoya al diagnóstico de septicemia antes de la confirmación bacteriológica, en el caso de infección bacteriana.**
- **Determinar si alguno de los parámetros observados por sí sólo apoya al diagnóstico de septicemia o si hay relación entre ellos.**

1.3 HIPOTESIS

La leucocitosis, la neutrofilia, la desviación a la izquierda en la cuenta diferencial de leucocitos, la observación de cambios morfológicos, son parámetros tempranos útiles en el apoyo al diagnóstico de septicemia.

CAPITULO II

ANTECEDENTES

2.1 INFORMACION GENERAL SOBRE EL TEMA

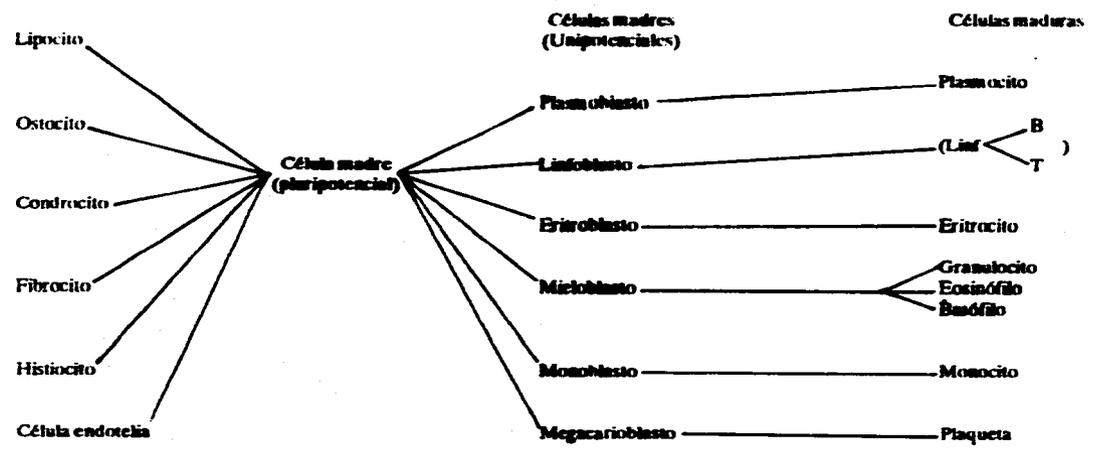
ONTOGENIA DE LAS CELULAS SANGUINEAS

Uno de los mayores órganos del cuerpo humano es el tejido hematopoyético. La génesis, diferenciación y función de las células sanguíneas se inician en el embrión en islotes sanguíneos, generados a partir de células del mesodermo entre los días 19 - 20 de gestación. El proceso continúa en la etapa fetal primero en el hígado (conocido como fase megaloblástica o eritroide) entre la 5ª y 6ª semana de gestación; concomitante con esto el bazo se activa entre la 16ª y 20ª semana dando entrada las series megacariocitoide y granulocitoide. El período cumbre es en la 24ª semana donde la médula ósea empieza a regir como surtidor o alimentador de células hematopoyéticas, lo que continuará hasta la muerte del sujeto.

En los sitios de hematopoyésis existen dos poblaciones celulares: la primera son células transitorias (blastos) con dos características básicas (a) autorrenovación y (b) capacidad para diferenciación y la segunda población son células que se caracterizan por fidelidad de línea y no autorrenovación. Continúan su proceso hasta la madurez donde adquieren la capacidad de ser funcionalmente competentes. Todo este proceso está resguardado en un microambiente hematopoyético que consta de células estromales, fibroblastos y macrófagos así como de factores solubles conocidos como factores de crecimiento, y la regulación principal esta dada por la demanda del sistema. (1,3)

2.1.1 MORFOLOGIA.

Los patrones básicos de maduración general de células hematopoyéticas son:



- a) **Tamaño:** A mayor grado de inmadurez, la célula es más grande. Conforme envejece es más pequeña.
- b) **Relación núcleo citoplasma:** En una célula inmadura la relación es desde 3 a 1 a favor del núcleo. En la célula madura la relación es 1 a 3 a favor del citoplasma.
- c) **Basofilia:** Existe un mayor grado de basofilia en células inmaduras al llegar la madurez desaparece.
- d) **Gránulos:** En las células inmaduras no existen gránulos, conforme madura la célula los va generando. Como caso especial hay presencia de gránulos primarios en etapa de promielocito, y gránulos secundarios en etapa de mielocito.
- e) **Núcleo:** En la célula inmadura el núcleo es grande, redondo u oval; un caso en particular son los granulocitos en los cuales el núcleo se va modificando hasta llegar a ser segmentos en su etapa de madurez.

En lo que respecta al eritrocito, conforme éste va madurando, el núcleo es picnotizado y extraído del citoplasma, hasta ser células anucleadas transportadoras de hemoglobina.

- f) **Cromatina:** En células inmaduras es fina, laxa, con semejanza a un panal; conforme madura hay mayor concentración de heterocromatina y menos concentración de eucromatina.

Las células comisionadas por un estímulo hematopoyético dan origen a 2 tipos celulares; el primero es una célula blasto con características de célula tronco. La segunda genera una línea con características y funciones específicas de la línea celular linfóide, mielóide, eritroide y megacariocítica. (1)

Los patrones de maduración son similares en las líneas excepto para el megacariocito, que es inversa.

Nos concretaremos a mencionar características morfológicas normales de las líneas involucradas como son la línea mielóide, línea monocítica y linfóide en procesos infecciosos.

MIELOBLASTO:

El diámetro de esta célula va de 10 a 18 μm . La relación núcleo citoplasma es de 5:1 a 7:1, el color del citoplasma es azul. El núcleo es largo, redondo o ligeramente oval.

La cromatina le da una apariencia de perforaciones ligeramente rojo-púrpura. Se localizan de 2 a 5 nucléolos color azul pálido. El citoplasma es basofílico y generalmente no es clara la zona cerca del núcleo. No existen granulaciones. (1,2,3)

PROMIELOCITO:

Contiene gránulos primarios, azurofílicos o no específicos; son grandes gruesos y pueden ser identificados en el estado de su estructura fina como característica de los neutrófilos, eosinófilos o basófilos.

Contiene peroxidasa, fosfatasa ácida y otras enzimas lisosómicas. Los gránulos específicos persisten por todo el resto de la secuencia de maduración y son vistos en subsecuentes estados incluyendo formas polimorfonucleares. Son no lisosómicos, contienen fosfatasa alcalina, son oxidasa negativa. Su núcleo mide 12 a 20 μm . Su relación núcleo citoplasma es 5:1 siendo el núcleo redondo u oval ligeramente rojizo púrpura. Presenta de 2 a 5 nucléolos azul pálido; presenta basofilia en el citoplasma pero es más claro que el mieloblasto. Contiene granulaciones azurofílicas. Tiene una cromatina en forma de red. (1,2,3)

MIELOCITO:

Tiene de 12 a 18 μm de diámetro; tiene una cantidad moderada de citoplasma en relación 2:1 con el núcleo. El color del citoplasma es rosa-azulado. El núcleo es oval o ligeramente indentado de color rojizo-púrpura. Raramente se observan nucléolos. Las granulaciones son azurofílicas más específicas.

METAMIELOCITO O JUVENIL:

Mide de 10 a 28 μm de diámetro. La relación núcleo citoplasma es 1.5:1 siendo el citoplasma de color rosa; el núcleo es central en forma de herradura o arrifonado. No hay nucléolos. Las granulaciones son neutrofílicas, eosinofílicas o basofílicas. (1,2,3).

BANDA:

Tiene un diámetro de 10 a 16 μm . El citoplasma es abundante de color rosa o azul pálido; existe una relación núcleo citoplasma 1:2. El núcleo es central en forma de banda de cuerpo uniforme. No contiene nucléolos. Las granulaciones pueden ser neutrofílicas, eosinofílicas o basofílicas. (1,2,3)

SEGMENTADO:

Esta célula mide aproximadamente de 10 a 15 μm de diámetro. El citoplasma es abundante de color rosa tenue; existe una relación núcleo citoplasma 1:3. El núcleo es central en forma de lóbulos, siendo éstos de 2 a 5. No existen nucléolos contienen granulaciones finas color rosa o rosa violeta. Las granulaciones en el segmentado eosinófilo son carmín y el segmentado basófilo presenta granulaciones azul negro. (1,2,3).

MONOBLASTO:

Esta célula presenta de 14 a 18 μm de diámetro. El citoplasma es basófilo, en cantidad moderada. Su núcleo es largo con pequeña indentación. Contiene de 1 a 2 nucléolos largos. No contiene granulaciones.

PROMONOCITO:

Tiene un diámetro de 20 μm . El citoplasma es gris-azul opaco, con finos gránulos lila. El núcleo es largo moderadamente indentado; la cromatina es fina. No contiene nucléolos. Existe una considerable basofilia en el citoplasma. Se observan finos gránulos lila. (1,2,3).

MONOCITO:

Tiene de 16 a 20 μm de diámetro; el citoplasma es abundante de color grisáceo o grisucio. El núcleo es largo, oval o indentado, central. Raramente se presentan de 1 a 2 nucléolos. Contiene unos finísimos gránulos lila. (1,2,3)

LINFOBLASTOS:

Tiene un diámetro de 10 a 18 μm . Tiene citoplasma escaso de color azul claro. El núcleo es periférico o central, redondo u oval de color rojo-purpurino. Se observan de 1 a 2 nucléolos. No hay gránulos. (1,2,3)

PROLINFOCITO:

Mide de 9 a 18 μm , su núcleo redondo o indentado, su cromatina es ligera. Tiene de 0 a 1 nucléolos. Se hallan en algunas ocasiones en sangre normal con mayor frecuencia en niños especialmente en aquellos que padecen infecciones crónicas de vías respiratorias altas. Es intermedio en tamaño del linfocito grande y pequeño. Un rasgo importante es la intensa coloración basófila del citoplasma, el cual es homogéneo y agranular. (1,2,3).

LINFOCITO:

El linfocito maduro tiene un diámetro de 10 μm ; el citoplasma puede ser escaso con relación al núcleo o abundante. El núcleo es azul-purpúreo y está compuesto por una densa agregación de cromatina, tiene una forma redonda. Los nucléolos no son usualmente visibles con las técnicas ordinarias. Los gránulos comúnmente están ausentes del citoplasma, pero en algunas células se pueden observar de color rojo-violeta (gránulos azurófilos).

LINFOCITO GRANDE:

Mide de 10 a 15 μm con núcleo redondo o indentado, cromatina moderada pálida, no tiene nucléolos. El citoplasma es más abundante que en el linfocito pequeño, con frecuencia contiene gránulos azurófilos. La presencia de una zona clara perinuclear es rasgo diferencial.

LINFOCITO PEQUEÑO:

Mide de 6 a 10 μm tiene un núcleo redondo o indentado; se observa una ligera cromatina. Tiene de 0 a 1 nucléolos. El núcleo ocupa casi toda la célula y presenta una tinción más intensa en su periferia. (1,2,3,4)

2.2 ANORMALIDADES

En los neutrófilos, linfocitos y monocitos de pacientes con infección se pueden observar cambios degenerativos; el excedente de estas alteraciones en la célula nos va a reflejar la severidad de la enfermedad del paciente. El reconocimiento de anomalías en las células sanguíneas nos puede alertar hacia el diagnóstico de septicemia. Infección es el proceso por el cual el parásito (organismo que vive sobre o dentro de otro organismo vivo), entra en relación con el huésped. Las vías de entrada

más frecuentes son el aparato respiratorio (boca y nariz), el aparato digestivo, el aparato genitourinario y las escoriaciones en la superficie de las mucosas y piel.

La septicemia es una infección generalizada. Además de la vía de entrada invade torrente sanguíneo.

Los métodos consagrados por el tiempo para evaluar los cambios en los glóbulos blancos incluyen recuento y diferenciación de los leucocitos. Los primeros descubren fluctuaciones numéricas y los segundos indican conocimiento sobre el tipo y grado de madurez de las células en cuestión. (29.3)

2.2.1 CUENTA DIFERENCIAL.

La cuenta diferencial se refiere a la enumeración y clasificación de los leucocitos vistos en el frotis sanguíneo teñido. El procedimiento usual es contar mínimo cien leucocitos sistemáticamente al mismo tiempo buscando en el frotis un área de buena distribución celular.

De la cuenta total de leucocitos y la cuenta diferencial, la concentración absoluta de cada tipo de leucocito se puede calcular.

La exactitud de el resultado depende de la variabilidad de la cuenta de leucocitos totales y la cuenta diferencial. La concentración absoluta de leucocitos provee de mayor exactitud que la cuenta diferencial porque, en esencia, cada tipo de leucocitos es un sistema celular separado, con sus particulares funciones, control de mecanismos, y respuestas a procesos infecciosos.

Varios sistemas de cuenta diferencial fueron empleadas en un tiempo. Arneht, por ejemplo, registra cuidadosamente y tabula de izquierda a derecha, el número de leucocitos neutrófilos con 1,2,3 etc. lóbulos y hace otra subdivisión.

El término "desviación a la izquierda" es derivado de esta práctica e indica un incremento en la proporción de células con sólo uno o pocos lóbulos, mientras que "desviación a la derecha" representa un incremento en la proporción de multisegmentados. Schilling usa el término "desviación degenerativa" para referirse al incremento de juveniles y mielocitos que aparecen en sangre en respuesta a un proceso agudo y desviación degenerativa la izquierda, indica un fracaso a la maduración como un resultado de una función deprimida de la célula.

El apunta que de acuerdo a la desviación es de un tipo más reciente y aumenta el número de formas inmaduras encontradas en sangre, pero el núcleo de estas células, es escaso en forma de T, V o U, y muestra pequeña estructura detallada (Stabkernige o células en cayado). (1.6)

Desde un punto de vista clínico es usado para determinar si formas jóvenes de neutrófilos (banda y jóvenes) está aumentando y el cual es la proporción de incremento de formas multinucleadas. Un incremento de formas jóvenes (bandas, metamielocitos y mielocitos, desviación a la izquierda) sugiere un incremento en la liberación de neutrófilos jóvenes en el nacimiento de la médula; esto se ha observado que se asocia a infecciones agudas e inflamación. Alteraciones en el número total de leucocitos y su proporción relativa son de significancia considerable a medida de las reacciones del cuerpo a agentes nocivos. De ese modo en resumen, marcando la presencia de neutrófilos jóvenes o en presencia de números aumentados en el frotis sanguíneo, es indicativo de cierto proceso infeccioso. (22)

Valores normales: En los adultos es de 4 000 - 11 000 /mm³.

Los valores normales en niños van a variar de acuerdo a la edad de los mismos:

| | |
|-----------------|-----------------------------------|
| recién nacidos; | 10 000 a 25 000 / mm ³ |
| 1 año; | 6 000 a 18 000 / mm ³ |
| 4 a 7 años; | 6 000 a 16 000 / mm ³ |
| 8 a 12 años; | 4 500 a 18 000 / mm ³ |

(6)

2.2.2 NEUTROPENIA

Es el descenso del número absoluto de neutrófilos hasta niveles por debajo de 1 500 / mm³. Fisiológicamente los leucocitos neutrófilos fagocíticos y los macrófagos protegen contra las infecciones bacterianas y algunas fúngicas. Un número mínimo de células polimorfonucleares en la sangre periférica es esencial para la función fagocítica adecuada; por lo tanto niveles neutropénicos lleva implícito el peligro de mayor susceptibilidad a la infección. (1,2,21)

2.2.3 NEUTROFILIA

Se entiende por neutrofilia al aumento del número de neutrófilos por arriba de los valores normales.

Dentro de los cambios degenerativos que se pueden observar tenemos: vacuolas, granulaciones tóxicas, cuerpos de Döhle, hipersegmentación e hiposegmentación. (1,2)

a) Vacuolización

La fagocitosis y digestión bacteriana por los neutrófilos fueron reconocidas en el siglo XIX, recientemente fue demostrado que la digestión de la bacteria por neutrófilos depende de enzimas líticas liberadas de los gránulos (lisosomas) dentro de la célula blanca. Los productos

de la digestión aparentemente son encerrados dentro de las vacuolas las cuales son formadas por invaginación de la membrana celular y la fusión de esta membrana con la membrana del lisosoma.

Las vacuolas pueden representar degeneración ósea o pueden deberse a autofagosomas porque se observan con frecuencia en septicemia, asociadas a granulación tóxica. El fenómeno de la vacuolización desaparece dentro de las 12 a 24 horas del tratamiento. (6,22,23,24)

b) Granulaciones tóxicas

Reflejan un defecto en la maduración del neutrófilo con persistencia de gránulos azurofilicos en estados maduros de la célula o son el resultado de adsorción de agentes tóxicos que resultan en una nueva formación anormal de gránulos; por otra parte algunos gránulos tóxicos (como lo demuestra la microscopía electrónica) pueden representar lisosomas secundarios o autofagosomas que contienen inmunocomplejos.

Los autofagosomas son lisosomas que se han fusionado con una vacuola fagocítica y han descargado su contenido enzimático en la misma.

También por estudios histoquímicos ahora han demostrado que las granulaciones tóxicas son gránulos azurofilicos (primarios), que son peroxidasa positiva y son más fácilmente teñidas que los gránulos de células normales. Un incremento de gránulos asociados a fosfatasa ácida en células conteniendo granulaciones tóxicas sugieren que han sido liberados gránulos azurofilicos enzimáticos.

Este hallazgo y el incremento en la actividad de la fosfatasa alcalina que puede también ser visto en infecciones, implica que los neutrófilos son estimulados de una manera similar en la cual las células llevan a cabo un proceso de fagocitosis o reaccionan a un estímulo de endotoxinas. En la infección severa, en el envenenamiento químico y en los estados tóxicos el citoplasma puede contener granulaciones tóxicas. (6,22,23,24)

c) Cuerpos de Döhle (amato)

Son inclusiones citoplasmáticas irregulares teñidas de azul que varían desde el tamaño de cocos hasta unos 2µm de diámetro; son ovales o redondos a veces escasamente visibles. Son amorfos, tienden a presentar contorno circular o elíptico. Se encuentran en infecciones severas y desaparecen cuando la infección cede. Se encuentran después de quimioterapia, aparecen al 1° o 2° día después de una quemadura y en infecciones por escarlatina. Se observan en mielocitos, metamielocitos, bandas, neutrófilos, eosinófilos y basófilos. (6,22,23,24)

d) **Hiposegmentación**

También conocida como anomalía de Pelger-Huet la cual se caracteriza por marcada condensación de cromatina nuclear en todos los glóbulos blancos y menor lobulación de los neutrófilos, de modo que casi todas las células polimorfonucleares son bilobulares o en forma de bandas.

La anomalía es congénita (verdadera anomalía de Pelger-Huet) o adquirida (seudoanomalía de Pelger-Huet). La forma adquirida se puede observar en enfermedades sanguíneas o en tratamientos con vitamina B₁₂. (29.1)

e) **Hipersegmentación**

La primera dificultad es la clara definición de que constituye un lóbulo separado; una definición usada es hablar de la completa separación de lóbulos nucleares o sin unión de filamentos.

Después se tienen que contar el número total de lóbulos nucleares en cien, calcular el promedio de número de lóbulos por neutrófilos y comparar el resultado con valores normales. Un incremento en la cuenta media de lóbulos de neutrófilos, sugiere deficiencia de ácido fólico, hipersegmentación congénita o enfermedad renal. También la presencia de multilobulados en el frotis sanguíneo es indicativo de un cierto proceso infeccioso. (29.1)

2.2.4 LINFOCITOSIS

Es un incremento significativo de los linfocitos, que motiva la presencia de una leucocitosis moderada o intensa. Linfocitos atípicos se han observado en variedad de enfermedades virales. Después de la 1ª semana de vida, predominan hasta los 4 ó 5 años. (1,2)

2.2.5 LINFOPENIA

Se refiere a un decremento por debajo de 1.5×10^9 cels. / l. (1,2)

Dentro de los linfocitos se han descrito con diferentes nombres y existen en gran número de estados. Se llaman inmunocitos porque intervienen en la inmunidad humoral y sirven como "banco de memoria" de la experiencia inmunológica previa. Downey y Mc Kinlay describen en base a la morfología:

- I Linfocitos plasmocitoides
- II Linfocitos blastoides
- III Linfocitos monocitoides

I Linfocitos plasmocitoides

Esta célula es mayor que los linfocitos normales, posee una forma redonda u oval. Con citoplasma intensamente basófilo, núcleo pequeño, cromatina en grumos gruesos que posee distribución en rueda de carro. El citoplasma puede contener gránulos azurófilos diseminados, pero más importante es la presencia de finas vacuolas múltiples que dan aspecto esponjoso o espumoso.

Las células de Türk tienen el mismo tamaño que las células plasmocitoides y se relacionan con ellas. Se pueden considerar linfocitos atípicos. El citoplasma se tinte en azul con más intensidad que las células plasmáticas; posee núcleo excéntrico, la cromatina no se distribuye en rueda de carro. El número aumentado de estas células se observa en anemias graves, sarampión, rubéola, agranulocitosis e infecciones crónicas en especial si cursan con leucocitosis intensa. (3)

2.2.6 MONOCITOSIS

Monocitosis se refiere a un incremento en el número de monocitos por arriba de $750/\text{mm}^3$ ($0.75 \times 10^9 / \text{l}$), en niños y $440/\text{mm}^3$ ($0.44 \times 10^9 / \text{l}$) en adultos. A veces se observa en una subaguda endocarditis bacteriana, brucelosis, tifoidea, rickettsiosis, kala-azar, colitis crónica ulcerativa, enteritis regional, enfermedades de la colágena, tripanosomiasis, enfermedad de Hodgkin's, esto nos indica que la monocitosis frecuentemente acompaña a infecciones agudas y activas. (1,2)

2.3 DINAMICA LEUCOCITICA

Aunque la función de los leucocitos es defender al organismo, se ha conocido por estudios de Metchnikoff en 1892, y es evidente que cada una de las diversas líneas celulares de leucocitos tiene propiedades especiales y no como único papel la defensa sanguínea.

Básicamente la función es de multiplicación celular, maduración, almacenaje y liberación de la vía sanguínea a tejidos y sitios de infección o células dañadas. Estos procesos se refieren a la dinámica del leucocito y es diferente para cada tipo de leucocito. (1,2,3)

2.3.1 DINAMICA DEL NEUTROFILO EN SANGRE

Por largo tiempo se ha venido aceptando que los neutrófilos emigran a sangre y continuamente son reemplazados, pero no es usual apreciar que tan grande proporción de granulocitos en sangre no es importante en la corriente circulatoria.

Es bien conocido que varias influencias fisiológicas tales como ejercicio, excitación y otros factores pueden asociarse con el incremento en la cuenta de leucocitos, y esto fue atribuido a la liberación de leucocitos secuestrados por el bazo. De cualquier modo, valores observados han recordado el hecho que tales cambios también ocurren en personas esplenectomizadas. (1,2,3).

2.3.2 MIGRACION DE NEUTROFILOS A TEJIDOS Y SITIOS DE DESTRUCCION

Los sitios en los cuales los neutrófilos normalmente desaparecen no son bien entendidos. Neutrófilos sanguíneos marcados son encontrados en saliva pero la pérdida en la saliva puede reflejar una infección subclínica desde algunas a ninguna célula son encontradas en conductos salivales; la proporción a la cual los gránulos entran a la cavidad oral ha sido correlacionado con el grado de gingivitis. No obstante algunas células van a penetrar a la mucosa oral en personas sanas; probablemente como resultado de diapédesis.

La pérdida de leucocitos en orina también se ha demostrado en sujetos normales, esto aumenta, marcadamente en pielonefritis. Por añadidura, cateterización arteriovenosa estudiada en perros y hombres proporcionan evidencias que sugieren que leucocitos también son removidos continuamente del pulmón, el hígado y el bazo. Números significativos tal vez perdidos en el tracto intestinal.

El sitio local de tejido dañado o con infección, la adherencia de neutrófilos a las células endoteliales o a la pared venosa y su subsecuente migración al tejido puede ser visto casi en minutos. Aunque se ha sugerido que la quimiotaxis presenta una mejor explicación de la adherencia y migración esto no es prueba de este caso.

Después de la adherencia inicial de neutrófilos puede ser vista y proyectada por pseudópodos entre células endoteliales y una fuerza en el pasaje entre ellos. Además de la migración es dilatada por la base de la membrana y la células periendoeliales y los neutrófilos pueden moverse paralelamente o abajo del endotelio hasta el pasaje circundante al tejido conectivo encontrado.

Esto no es evidencia de la lisis de los gránulos de los neutrófilos, sugiere que el pasaje es hecho disolviendo células interendoeliales aglutinando sustancias o fibrillas de colágeno y esto no es

evidencia morfológica consistente o cambio de células endoteliales. Una vez que los neutrófilos salen a sangre retornan en números significativos. (1,2,3)

2.3.3 FAGOCITOSIS DE PARTICULAS.

La principal función de los neutrófilos granulocitos es prevenir o retardar la intrusión de agentes infecciosos y otro material extraño en el huésped. Esto es acompañado por fagocitosis y digestión de material. Los neutrófilos también liberan varias sustancias en su ambiente y tienen también funciones secretoras.

Endocitosis es el proceso por el cual el material es tomado dentro de la célula encerrando las piezas dentro de la membrana plasmática, algunas veces ocurre una liberación en el citoplasma de la célula.

La endocitosis se divide en pinocitosis y fagocitosis. La fagocitosis puede usualmente ser vista al microscopio de luz, mientras que la pinocitosis no, porque en la ingestión envuelve partículas muy pequeñas, así como macromoléculas. Ambos procesos implican invaginación de la membrana celular y la formación de vesículas o vacuolas (fagosomas).

La mayoría de las células son capaces de pinocitosis, pero fagocitosis es una actividad prominente de neutrófilos, monocitos, macrófagos y en menor cantidad eosinófilos y basófilos. Macrófagos, neutrófilos y polimorfonucleares ingieren material extraño (bacterias y variedad de partículas) pero rara vez ingieren células autólogas, similar actividad selectiva de partículas parece ocurrir in vivo. Neutrófilos y macrófagos son móviles y de ese modo migran libremente a sitios de inflamación.

Una vez en el área de inflamación ellos entran en contacto con el material extraño, lo engloban y es sometido a enzimas bactericidas y digestivas que contienen. Esto fue apreciado primeramente por Metchnikoff en los ochentas cuando observó la migración de fagocitos en áreas de tejido dañado en esponjas y en animales inferiores.

Por estudios posteriores él concluyó que la resistencia a infecciones resulta de actividades de células fagocíticas. De cualquier modo, se empezaron trabajos a cerca de la misma demostración de actividad antibacterial en suero, y cerca de los noventas el concepto de que opsoninas en suero, envuelven a la bacteria y se ejecuta una fácil digestión por fagocitosis es ahora más conocida.

Las células fagocíticas vienen a ser consideradas como células pasivas en resistencia a la infección. Esto se confirmó cuando se demostró que la fagocitosis aumentó, de neumococo previamente expuesto a suero resultando un envolvimento de la bacteria con anticuerpo y complemento.

Por muchos años la fagocitosis fue más bien dependiente de una tensión de la superficie de la célula o efectos de cambio y que el envolvimiento no expide energía. Esta consideración fue mantenida constante aunque fue señalado en 1933 que durante la fagocitosis de una bacteria, los leucocitos muestran un esfuerzo extra de desgaste de oxígeno.

La importancia de una célula fagocítica así mismo como la defensa del cuerpo no había sido reemplazada hasta los cuarentas, y más tarde cuando Wood mostró que la autoaparición de infección fue decidida antes de aparecer anticuerpos específicos en el suero. El demostró la habilidad de neutrófilos para atrapar y digerir organismos en la sustancia de anticuerpos y factores del suero y el proceso llamado "fagocitosis de superficie".

Ha sido mostrado que al proceso de fagocitosis antecede nitrógeno atmosférico puro como oxígeno, que no es inhibido por cianuro o dinitrofenol y que inhibidores de glicólisis inhiben la fagocitosis. Desde los años cuarentas, el conocimiento de quimiotaxis, reconocimiento y adsorción, actividad de opsonina, endocitosis, función bactericida, digestión y procesos asociados fueron conceptos que se fueron acumulando y después de años de controversia ahora se sabe que todos ellos están relacionados.

El granulocito maduro es la célula fagocítica más activa de la serie granulocíticas, aunque los juveniles, las bandas, los eosinófilos y basófilos (y monocitos) también toman parte en la fagocitosis; el proceso de ingestión y digestión de material extraño tiene cuatro componentes:

- 1.- Quimiotaxis o leucotaxis (incluyendo migración).
- 2.- Opsonización.
- 3.- Ingestión.
- 4.- Deagranulación, muerte, digestión y destrucción del cuerpo extraño.

1.- QUIMIOTAXIS.

Es la capacidad de los neutrófilos para percibir la presencia de sustancias extrañas particuladas en el medio y trasladarse hacia ellas (locomoción directa). Aunque la movilidad de los neutrófilos y su concentración en lesiones inflamatorias fue apreciada en experimentos anteriores, el desarrollo de dos compartimientos de la cámara con membrana permeable a leucocitos, y la separación de los compartimientos permitieron una cuantificación de quimiotaxis in vitro y una fácil investigación de factores quimiotácticos.

Por tales estudios es evidente que ambos, neutrófilos y fagocitos mononucleares muestran migración direccional bajo la influencia de agentes quimiotácticos, pero un gradiente de concentración es necesaria para que ocurra la migración. En la ausencia de gradientes, pero con factores quimiotácticos

presentes, casualmente la migración es mejorada y ocurre localización de los fagocitos.

La quimiotaxis parece estar mediada por dos formas; citotoxinas, las cuales tienen una directa acción en fagocitos (caseína, ciertos filtrados bacteriales, y fusión de productos de bajo peso molecular de los componentes del complemento C_{5,6,7} y posiblemente C₃, y un complejo de C_{3,6,7}) y citotoxígenos los cuales no son quimiotácticos pero generan factores quimiotácticos después de interactuar con suero, plasma o componentes de complemento. Un ejemplo de citotoxígeno son antígeno-anticuerpo complejos, endotoxinas, ciertas bacterias, ciertas enzimas que reaccionan con componentes del complemento, y lisosomas de neutrófilos macrófagos o hígado. Ciertas citotoxinas parecen ser específicas de neutrófilos, (cultivos de filtrados de E. coli) y otros como la caseína inducen migración de ambos, neutrófilos y monocitos.

En general, los neutrófilos son atraídos por componentes de bajo peso molecular. Las aminas vasoactivas, bradicininas, serotoninas, histamina no tiene actividad quimiotáctica en cámara in vitro. Hasta ahora pocos estudios revelan la operación de factores quimiotácticos in vivo.

En conejos, en cámara de experimentos, casualmente el movimiento de leucocitos fue visto en el centro de daño pero procediendo éste a un movimiento direccional de leucocitos en el área. El movimiento causal es sugestivo como reflejo de leucocitos al área que contiene factor quimiotáctico pero con ningún gradiente de concentración para indicar la dirección.

2.-OPSONIZACIÓN: Reconocimiento y adsorción de partículas.

Los fagocitos distinguen partículas extrañas y células autólogas dañadas de los mismos restos componentes normales, ésta capacidad obviamente es la esencia de una función fagocítica. Los neutrófilos de perro han demostrado la unión de IgG la cual aumenta su capacidad fagocítica por estafilococo en ausencia de complemento.

En otros estudios un alfa-1-glicoproteína es capaz de aumentar la fagocitosis en ausencia de complemento, fue encontrada en embrión de rata y suero de cerdo guineo. La presencia de esta actividad en animales fuera de una exposición anterior a antígenos extraños sugiere que no es un anticuerpo y puede relacionarse con reconocimiento y adsorción de materiales extraños.

Se ha mostrado que los neutrófilos de cerdo guineo y ovejas requieren cationes divalentes (Ca⁺⁺ o Mg⁺⁺) para la adsorción y digestión de partículas, y leucocitos humanos requieren cationes para la unión a la superficie cargada. Probablemente en la ausencia de cationes divalentes, fuerzas repulsivas en la superficie de la bacteria y las células fagocíticas son suficientes para permitir sólo una interacción débil.

En la ausencia de una firme adsorción la bacteria no es digerida y puede ser desechada de la célula. Sin embargo en estudios con macrófagos parece que cationes divalentes no son necesarios para la adsorción de partículas pero sí para el momento de la digestión.

La osmolaridad de el medio es importante así como altas concentraciones de glucosa o sales puede impedir la fagocitosis y agregación de leucocitos. En ciertos tejidos como médula renal, tales factores pueden interferir como una fagocitosis deficiente, opsoninas, reconocidas como aumento de fagocitosis actúan primariamente sobre las partículas en vez de las células fagocíticas.

Las opsoninas incluyen anticuerpos específicos (calor estable), complemento (calor lábil), factores termolábiles no del complemento, y tal vez otros factores en el suero, tales como lisozima, el cual cuando adsorve sobre partículas se vuelven atractivas a células fagocíticas.

La acción de las opsoninas ha surgido como resultado de la disponibilidad de procesos para fraccionamiento de inmunoglobulinas y complemento en valores componentes. Por ejemplo, en estudios con conejos la actividad de opsoninas de anticuerpos a *Proteus mirabilis* los componentes de IgG fueron mostrados como una mejor digestión de organismos de proteus (en ausencia de complemento) con lo cual la fracción IgM tiene un pequeño efecto. En otros estudios con cerdos guineos, 75 anticuerpos fueron fraccionados en dos componentes, gamma 1 y gamma 2 .

Los anticuerpos gamma 2 se adhieren a macrófagos pero la fracción 1 no y ninguna fracción llega a adherirse a células polimorfonucleares. De ese modo, sólo ciertas fracciones de inmunoglobulinas parecen tener propiedades citofílicas y esto puede ser específico de sólo un tipo de células. La porción de anticuerpos que se adhiere a la célula es el fragmento Fc y así en las cadena H de la molécula.

Hay evidencia que *S. aureus* contiene proteína A, la cual se une inespecíficamente a la porción Fc de la IgG y por este medio bloquea la fagocitosis. Las investigaciones sugieren que la porción Fab de anticuerpo reacciona con organismos los cuales la porción Fc contiene sitios de enlace citofílico. De ese modo aparecen inmunoglobulinas que facilitan el contacto entre partícula y aquellos fagocitos con los sitios receptores necesarios. En el presente hay una buena evidencia de sitios de recepción en macrófagos y células polimorfonucleares.

La actividad opsonica del complemento y otros componentes lábiles al calor del suero parecen estar más complejos y son menos entendidos, pero hay sustancias en suero normal, que probablemente jueguen una importante rol en la motivación de la fagocitosis en la ausencia de un anticuerpo específico. (1,2,4)

3.-INGESTION Y DESGRANULACION.

La ingestión incluye invaginación de la membrana celular de modo que la sustancia particulada extraña que adhiere a la superficie de la célula fagocítica está encerrada por brazos citoplásmicos y así es transportada hasta una vacuola intracitoplasmática, el fagosoma. La ingestión de partículas por células fagocíticas requiere de liberación de energía y es acompañado o seguido inmediatamente por una variedad de complejos eventos bioquímicos.

Los neutrófilos aunque contienen citocromo y pueden usar mecanismos aeróbicos y anaeróbicos para producir energía, ellos utilizan glicólisis anaeróbica para desarrollar la fagocitosis. Durante la ingestión la partícula es envuelta por pseudópodos y la membrana celular invagina, encierra y lleva al interior. Esto es seguido rápidamente por una fusión de gránulos de lisosoma con el fagosoma y la liberación de contenido lisosomal, sustancias antibacterianas y enzimas digestivas dentro de la vacuola fagocítica. Son dos y tal vez tres distintos tipos de gránulos neutrófilos con diferente contenido de enzimas.

Después de una fagocitosis extensiva los gránulos lisosomales están esencialmente ausentes. Los diversos tipos necesitan participar en el proceso de desgranulación. La no migración de lisosomas de partes distantes de la célula hacia el fagosoma han sido reconocidas, pero en neutrófilos el contenido de gránulos específicos son liberados en el primer fagosoma (leucocito fosfatasa alcalina, fue detectada en fagosomas dentro de los primeros treinta segundos) mientras el contenido de los gránulos primarios fue encontrado en el último fagosoma (después de uno a tres minutos). El mecanismo de fusión fagosoma-lisosoma es desconocido, pero ha sido propuesto que la continua interacción de complemento y anticuerpo dentro de fagosoma libera lisolecitina el cual entonces actúa en la membrana lisosomal destruyéndola.

Le sigue la fusión de fagosomas y lisosomas. La fragilidad de lisosomas y pH ácido puede facilitar la fusión. Después de la fusión las bacterias son aniquiladas rápidamente y el material fagocitado es digerido. En el número de cambios metabólicos que han sido observados durante el transcurso de la fagocitosis: hay un ligero aumento en la glicólisis y producción de lactato y el pH cae dentro de las vacuolas fagocíticas; dos a tres veces se incrementa el consumo de oxígeno, (el cual es resistente a cianuro y por lo tanto no involucra oxidación en el citocromo mitocondrial), consumo de un carbón marcado de glucosa, convertido a CO_2 por la vía de las hexosas monofosfato incrementando de seis a siete veces (también resistente a CN y otros inhibidores metabólicos); la oxidación NADPH aumenta cinco veces, la oxidación NADH es aumentada treinta veces (pH 7.0), y la tinción tetrazolium nitroazul (NBT), es reducida a azul formazan aparentemente por NADH oxidada; la oxidación del formiato es aparentemente aumentada por interacción de la peroxidasa con el aumento en la cantidad de $H_2 O_2$ formado, hay aumento en la síntesis de los lípidos de membrana y los iones cloro y yodo son aparentemente oxidados vía catálisis de la mieloperoxidasa por la generación de peróxido de hidrógeno.

Más de estos eventos ocurren en el primero de varios minutos después de la ingestión de la partícula, la relación de un proceso al otro ha sido difícil aclarar. No obstante, el significado de estos cambios

metabólicos mostró que los neutrófilos de pacientes con enfermedad crónica granulomatosa (CGD) no exhiben consumo de oxígeno o utilización de glucosa vía de las hexosas monofostato, lo que normalmente ocurre en la fagocitosis, la ingestión, de la partícula y la desgranulación aparece normal en CDG, pero no la muerte de la bacteria, puede ser posible la separación de eventos metabólicos asociados con cada fase en comparación de eventos en neutrófilos normales y CGD.

Por tales estudios parece que aumenta la glicólisis y síntesis de lípidos en la membrana son partes integrales del proceso ingestión desgranulación.

4.- MUERTE BACTERIANA Y DIGESTION

Los cuerpos extraños (bacterias o los hongos) son ingeridos y atrapados dentro del fagosoma debido a la acción física de las lisozimas. Los gránulos primarios y secundarios de la célula polimorfonuclear se fusionan con el fagosoma, descargan su contenido enzimático en la vacuola y así matan a los microorganismos que encuentran dentro de ella. Este proceso provoca la desaparición de los gránulos del citoplasma y la consiguiente desgranulación. Las enzimas bacterianas de gránulos son lisozima y mieloperoxidasa, formando esta última un sistema antibacteriano cuando se combina con peróxido de hidrógeno.

Aunque decrece la acción bactericida en condiciones anaeróbicas en fagocitosis, no lo es, sin embargo es el "esfuerzo (estallido) respiratorio", mencionado anteriormente, que está relacionado a actividad bactericida.

La naturaleza de los eventos que tiene lugar, ha sido supuesta como el resultado de investigaciones extensivas de la patogénesis de enfermedad granulomatosa crónica.(1,3,4)

2.3.4 FUNCION SECRETORA DE LOS NEUTROFILOS

En relación a que el contenido de neutrófilos es liberado pasivamente como resultado de lisis celular, una variedad de sustancias son secretadas activamente por leucocitos in vitro; éstas se originan en fracciones de gránulos e incluyen ribonucleasa, desoxiribonucleasa, betaglucuronidasa, hialuronidasa, fagocitina, lisozima e histamina.

La vitamina B₁₂ ligada a alfa globulina y pirógenos leucocitarios han sido adicionados a la lista de productos secretorios. Estas sustancias se encuentra normalmente en el plasma y la concentración aumenta en pacientes con enfermedades involucrando al sistema de los neutrófilos. Los neutrófilos

pueden tener función secretoria in vivo y un rol fagocíticos.

La proteína ligada a alfa β_2 transcobalamina I funciona como almacenamiento de proteínas para vitamina B₁₂ y es muy poca aprovechable metabólicamente. Niveles altos de transcobalamina I se ven en leucemia mielocítica crónica y en metaplasia mielóide; y bajos en leucopenia crónica y anemia aplásica, y correlación con sangre pool granulocito. Esto sostiene la hipótesis que transcobalamina I es un producto secretorio de neutrófilos y la cantidad producida esta relacionada a la masa total del neutrófilo.

La lisozima está presente en gránulos primarios y secundarios de neutrófilos y esta presente en monocitos, suero, lágrimas y otras secreciones. Se encuentra aumentada en suero y orina en leucemias monocíticas y mieloblasticas.(30,32,1,3,23)

LISOZIMA

Es una proteína básica presente en los gránulos primarios y secundarios de los neutrófilos y es capaz de hidrolizar células de ciertas bacterias para su muerte. La acción de la enzima es significativa en la digestión.(1,3)

MIELOPEROXIDASA

Hay altas concentraciones presentes en los gránulos primarios de neutrófilos y se libera en fagosoma durante la lisis granular.

La mieloperoxidasa tiene actividad bactericida y antiviral.(1,3)

2.4 VALORES NORMALES Y VARIACIONES FISIOLÓGICAS

A la edad de cuatro a ocho años la cuenta diferencial de células sanguíneas se aproximan a las que se ven en adultos. Los valores fueron determinados por el uso de anticoagulantes sanguíneos y conectadores electrónicos, pero los resultados son esencialmente idénticos a los que se obtienen por medios hematocitométricos desde hace 30 años.

Metamielocitos o mielocitos no son frecuentemente observados en el examen de rutina de frotis sanguíneo, pero tales células se pueden encontrar en sangre normal con una búsqueda cuidadosa o más fácilmente, por examen de paquete concentrado 3.6/3000 gránulocitos, formas típicas mononucleares y fragmentos megacariocíticos conteniendo núcleo, también son vistas en tales frotis.

Hay diferencia significativa en la concentración de leucocitos entre sexos o con la edad avanzada y no están claros los reportes. Probablemente haya diferencia entre razas pero este tópico no ha sido estudiado extensivamente. Aunque la concentración de leucocitos es mantenida dentro de los límites definidos en hombres normales, ocurren fluctuaciones durante un día así como día con día.

Existen ligeras influencias de variación diurna, bajo condiciones de completo "reposo físico y mental" un nivel basal de 5.0 a 7.0 por 10^9 células / l es usual.

Ordinariamente la actividad puede ser asociada con un moderado incremento y una elevación en el nivel, es común en la tarde. Bajo todas estas condiciones sin embargo, la cuenta de leucocitos tiende a quedar dentro del rango "normal".

No hay una demostración conclusiva de los efectos de clima o estación en la cuenta de leucocitos. Calor e intensa radiación solar, son mencionadas como causas de leucocitosis. Calor artificial es una causa que induce linfocitosis. Luz solar y radiación ultravioleta son reportadas como causa de linfocitosis. Anoxia aguda y anemia causan leucocitosis. En los primeros días después de que un individuo llega a una altitud superior, se ha observado, algunas leucocitosis acompañadas por linfopenia y eosinopenia. Marcadas leucocitosis regularmente ocurren con ejercicio enérgico. Cuentas altas como 22.0×10^9 / l se han observado en un corredor después de 100 yardas rotas en segundos, y 35.0×10^9 / l complementando una cuartilla de milla corriendo en menos de un minuto.(1,3,6)

2.4.1 VARIACIONES DE LEUCOCITOS EN ENFERMEDADES

Han sido ampliamente reconocidas las alteraciones en la concentración de leucocitos en sangre y en las proporciones relativas de diversos tipos de leucocitos, como medida de la reacción del cuerpo a procesos infecciosos y a agentes nocivos. En muchas ocasiones estas alteraciones dan útiles indicaciones de la naturaleza de los procesos patológicos, y esto se observa no solamente en infecciones agudas, también en muchos padecimientos crónicos.(23,1)

2.4.2 LEUCOCITOS EN INFLAMACION

Ha sido enfatizado que la mayor función del leucocito ha sido efectuada en los tejidos y que los leucocitos en la sangre, en personas normales, transitan de los sitios de producción o almacén a los tejidos. Para esto es evidente que la variación de concentración en la sangre de cualquier tipo de

leucocito puede resultar por cambios en:

- 1.- El flujo de células a la sangre.
- 2.- El egreso de células a la sangre.
- 3.- La distribución de células dentro del sistema vascular ó
- 4.- Combinaciones de éstos.

Además, tales cambios pueden ser de breve duración o persistir por días hasta semanas; medir tales cambios en distribución, flujo y proporción de egreso, ha sido posible solamente en años recientes, y por sólo uno o dos de los tipos de leucocitos, no obstante, estos estudios han proporcionado algún conocimiento concierne al significado fisiopatológico de las variaciones en el leucocito vistos en estados de enfermedad.

En muchas infecciones bacterianas, neutrófilos ingieren y usualmente matan al organismo ofensor, al poco tiempo ellos mismos mueren. Usualmente son abastecidos en gran número rápidamente en tales infecciones.

Los macrófagos ingieren y remueven las células dañadas de los tejidos, células rojas y neutrófilos, en general, aparecen limpiando el área de daño; pueden de igual manera causar el proceso de fibrosis y reparación.

Usualmente los macrófagos no mueren en el desempeño de esta función y en realidad pueden ser estimulados a dividirse en el sitio de inflamación, de ese modo formar nuevas células.

En algunas situaciones los neutrófilos son incapaces de matar y digerir ciertos agentes extraños, embriones, brucela, microbacterias, toxoplasma, hongos; en estas circunstancias los macrófagos se tornan pesados envolviendo en la fagocitosis y matando al organismo, son abastecidos en cifras mayores para defensa del cuerpo.(1,3)

CAUSA DE NEUTROFILIA

Puede deberse a infecciones agudas, especialmente son causadas por cocos (estafilococos y estreptococos) y por algunos bacilos (E. coli), también por ciertos hongos (actinomicas), virus (rabia, poliomielitia, pequeños poxviruela) y parásitos (Coccidíoides immitis).

Otras inflamaciones presentan cuenta de leucocitos tan altas como 73×10^9 células, como las reportadas en pacientes con quemaduras severas.

CAUSAS DE NEUTROPENIA

Infecciones bacterianas: fiebre tifoidea, paratifoidea y algunas tularemias son comúnmente mencionadas como infecciones agudas acompañadas por leucopenia.(21,26,1).

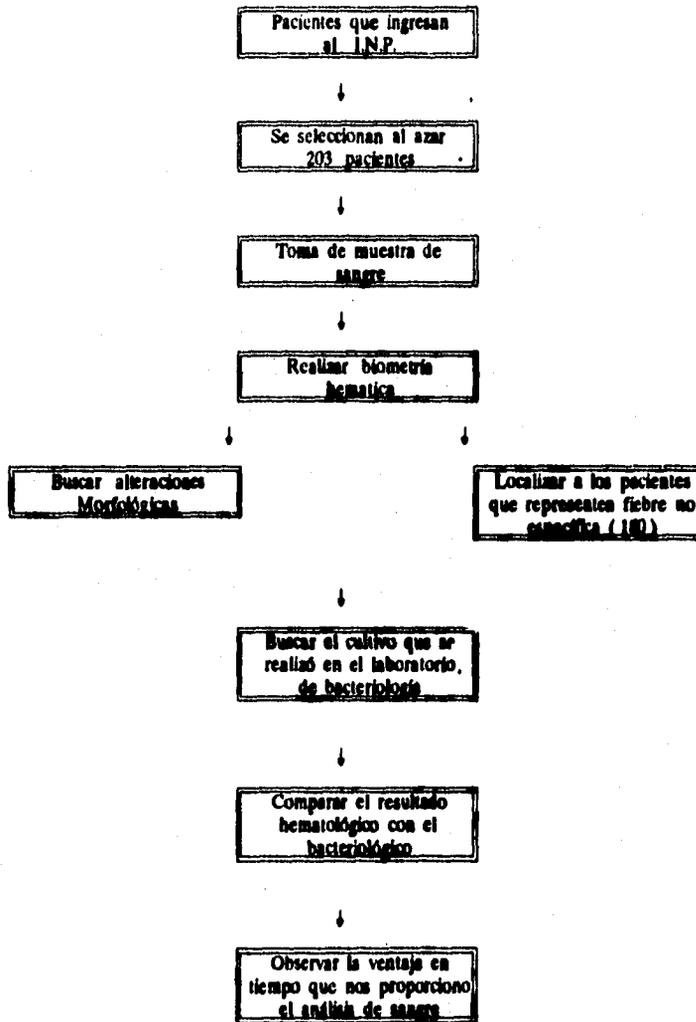
2.5 RASGOS MORFOLOGICOS DE LOS NEUTROFILOS EN SEPTICEMIA

Los neutrófilos de pacientes con infección frecuente muestran cambios degenerativos incluyendo picnosis, cuerpos de Döhle, granulaciones tóxicas y vacuolización. Esto ha sugerido que un excedente de estas alteraciones en la célula refleja la severidad de la enfermedad en el paciente. (5,22,29).

CAPTULO III

PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Diagrama de flujo



3.2 MATERIAL REACTIVOS Y EQUIPO

3.2.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Sangre periférica anticoagulada con EDTA

3.2.2 MATERIAL DE LABORATORIO:

Tubos de vidrio de 13 x 100
Porta objetos
Tubos de Wintrobe
Soporte para tubos de Wintrobe
Geringas
Reloj
Algodón con alcohol

3.2.3 REACTIVOS

EDTA (colocado en tubos de 13 x 100 en proporción para 3 ml. de sangre)

Tinción de Wright: 24 g ácido monocálcico de potasio
36 g ácido dibásico de sodio
80 ml de glicerina
20 g colorante
2 l metanol.

3.2.4 EQUIPO

Microscopio óptico
Plano para cuenta de leucocitos
Coulter S5

3.3 METODOLOGIA

3.3.1 TOMA DE MUESTRA

Se estudiaran niños con diagnóstico probable de septicemia que ingresen al Instituto Nacional de Pediatría. Aleatoriamente se eligieron 203 pacientes.

Se le realizará biometría hemática completa en el laboratorio de hematología y cultivos en el laboratorio de bacteriología.

Para realizar la cuenta de leucocitos se utilizará el aparato electrónico Coulter S5. La velocidad de sedimentación globular se hará por el método de Wintrobe. Para la cuenta diferencial de leucocitos se empleará el método de tinción de Wright. La cuenta de plaquetas se realizará por apreciación en el frotis de sangre periférica teñido con Wright.

3.3.2 TECNICA

Para mejor resultado se emplea sangre fresca venosa. Se empleó técnica de portaobjetos, la cual consiste en colocar una gota de sangre fresca cerca de un extremo de un portaobjetos limpio apoyando en una superficie horizontal plana y firme. Se coloca el portaobjetos extensor frente a la gota a un ángulo de unos 30° y dejar que la sangre se extienda en el ángulo entre los portaobjetos. Entonces, inmediatamente antes de que la sangre llegue a los bordes, empujar el portaobjetos extensor más allá de la gota de sangre para producir un frotis sanguíneo. Secar al aire.(2)

3.3.3 TINCION DE WRIGHT

Es un colorante policromático formado por la mezcla de un colorante ácido (eosina), que es rojo (-) y tinte los componentes básicos, así como la hemoglobina. También lo compone un colorante básico (azul de metileno) que es azul-violeta (+) y tinte los componentes ácidos de la célula, así como núcleo, citoplasma y RNA. Tratando el azul de metileno con álcali y calor se produce un color violeta en los tejidos; algunas estructuras se tinen con ambos colorantes, quizás las partes neutras. Este colorante policromado y eosina es el mejor pero precipita pronto. El proceso de tinción debe llevarse a cabo en una solución amortiguadora con pH = 6.4, la cual produce la ionización necesaria para que se produzca la reacción de los colorantes con los componentes de la célula. Durante un breve lapso, el colorante actúa como si los componentes acabaran de mezclarse. Después, claro está, tiende a formar un nuevo precipitado pero para entonces ha terminado la tinción y el portaobjetos debe haberse lavado.

Tenemos entonces que se tinte durante un minuto con el colorante, se agrega el amortiguador dejándolo actuar 30 segundos, se enjuaga con agua corriente y se deja secar al aire.(6)

3.3.4 CUENTA DIFERENCIAL

La cuenta diferencial se refiere a la morfología de los leucocitos de los cuales se distinguen dos tipos:

- a) Polimorfonucleares o granulocitos
- b) Monomorfonucleares o agranulocitos

Los polimorfonucleares se dividen en:

- 1) Neutrófilos
- 2) Basófilos
- 3) Eosinófilos

Los monomorfonucleares comprenden:

- 1) Monocitos
- 2) Linfocitos

Se examina en la porción delgada de la extensión donde los eritrocitos están en contacto pero no sobrepuestos. Se cuentan 100 leucocitos en total.

El estudio de los distintos elementos de la serie blanca se denomina fórmula leucocitaria relativa cuyo valores porcentuales normales son los siguientes:

| | |
|------------------------|-----------|
| Neutrófilo segmentados | 55 a 65 % |
| Bandas | 03 a 05 % |
| Eosinófilos | 01 a 04 % |
| Basófilos | 00 a 01 % |
| Linfocitos | 20 a 45 % |
| Monocitos | 03 a 08 % |

Si la fórmula leucocitaria relativa expresa los valores porcentuales la absoluta indica la cantidad de elementos por mm^3 que es importante para establecer con precisión la modalidad de una reacción leucopoyética.(2)

CUENTA DE LEUCOCITOS

Los dispositivos automatizados para la fórmula leucocitaria han sido desarrollados utilizando sistemas de flujo con análisis del tamaño celular y parámetros bioquímicos, o el reconocimiento del patrón celular en preparaciones de sangre fijadas o teñidas.

Los sistemas de flujo permiten un análisis rápido de numerosas células que incrementan así la exactitud del recuento y detectan células que figuran pequeñas cantidades. Para distinguir el tamaño celular se utilizan las mediciones de la dispersión o conductividad de la luz.(2)

Valores normales:

Adultos: 4 000 - 11 000 / mm³

Niños: recién nacidos; 10 000 a 25 000 / mm³
1 año; 6 000 a 18 000 / mm³
4 a 7 años; 6 000 a 16 000 / mm³
8 a 12 años; 4 500 a 10 000 / mm³

(2,6)

CAPITULO IV

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 RESULTADOS

Se trabajaron 203 muestras de pacientes con probable sepsis. De este número 180 niños presentaron sepsis. Los 23 niños restantes tuvieron causa múltiples de fiebre: por medicamentosis, algunos niños tuvieron interrupción de farmacoterapia, acidosis o alcalosis metabólicas, disfunciones respiratorias, etc.

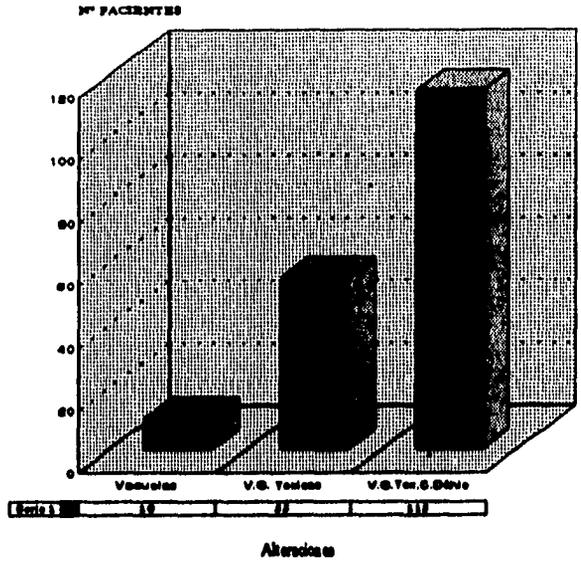
Al realizar las biometrías correspondientes a los 180 niños, presentaron algún cambio morfológico desde sólo vacuolas, granulaciones tóxicas con vacuolas o granulaciones tóxicas, vacuolas y cuerpos de Döhle (gráfica # 1).

Al presentarse más cruces de alteraciones morfológicas mayor fue el grado de sepsis, que después se comparó con los cultivos que se realizaron en el laboratorio de microbiología (gráfica # 2).

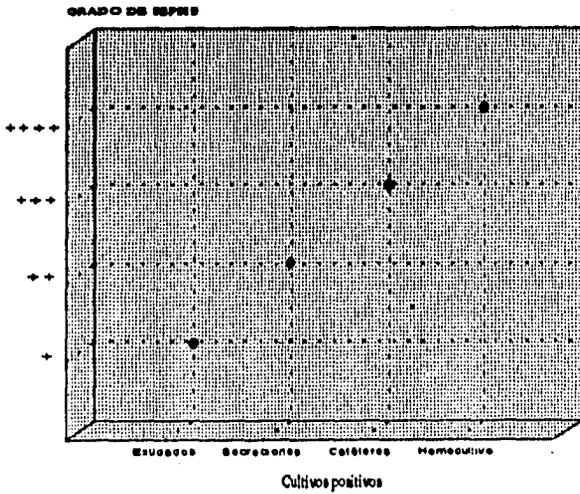
En estos pacientes los hemocultivos fueron positivos encontrándose klebsiela, pseudomona, proteus, candida, estreptococos y estafilococos.

Los focos infecciosos más frecuentes fueron: catéteres, secreciones de heridas, secreciones bronquiales, gastrointestinales. Por lo cual los cultivos que tomamos en cuenta fueron: exudados, cultivos de catéter y hemocultivos. (Gráfica # 3).

GRAFICA # 1



GRAFICA # 2



GRAFICA # 3

| ALTERACIONES MORFOLOGICAS | CULTIVOS | | | |
|------------------------------|-----------|-----------|---------|-------------|
| | EXUDADO | RECUBRION | CATRTER | HEMOCULTIVO |
| VACUOLAS | (10) + | (23) | (32) | (113) |
| VACUOLAS G. TOXICAS | | + | + | |
| VACUOLAS G. TOXICAS C. DOHLE | | | | + |

PACIENTES CON CULTIVOS POSITIVOS Y SU RELACION CON LAS ALTERACIONES MORFOLOGICAS

4.2 DISCUSION

La septicemia es muy frecuente en el lactante y es altamente letal. La enfermedad en sus etapas avanzadas se manifiesta por signos y síntomas en múltiples aparatos y sistemas que hacen el diagnóstico relativamente sencillo.

El diagnóstico temprano de la septicemia es difícil por lo escaso e inespecífico de las manifestaciones clínicas.(14,20)

Se han intentado diferentes exámenes pero con poca utilidad clínica por la inconsistencia de sus resultados o poca accesibilidad de los métodos en el laboratorio.(18)

Se realizaron estudios observando disminución de las plaquetas, ya que se asoció con septicemia pero por sí sola esta medición no es de gran ayuda; en este estudio no se pudo estandarizar, por lo tanto no lo pudimos tomar en cuenta.(23)

Se han hecho algunos planteamientos con respecto a la velocidad de sedimentación globular, y su relación con sepsis.

También se tomó en cuenta, pero tampoco se pudo confiar pues a veces, el paciente es neonato lo cual impide tomar demasiada muestra sanguínea, por lo tanto no la pudimos relacionar, además es inespecífico y puede alterarse por múltiples causas.(5)

Nuestro método tiene la ventaja de emplear poca muestra, tan sólo una gota nos permite observar las alteraciones morfológicas.

Como se pudo observar al comparar la positividad en los cultivos, sobre todo en los hemocultivos, la morfología nos mostró mayor presencia de alteraciones (granulaciones tóxicas, vacuolización y cuerpos de Döhle).

En algunos pacientes el hemocultivo fue negativo pero algún cultivo mostraba la presencia de la infección, que a la vez se empezaba a reflejar en la morfología sanguínea; en estos pacientes al repetir la biometría a las 24 o 48 horas ya presentaban más rasgos de sepsis y en ese momento se realizó el hemocultivo observándose su positividad, rasgo de que la infección se había extendido y ya era una infección generalizada.

También en comparación con el hemocultivo podríamos observar otras ventajas: cantidad de muestra y tiempo de obtención de resultados.

El trabajar con niños implica la dificultad de obtener la muestra, ya que si es un neonato o recién nacido de bajo peso, la cantidad de sangre requerida para el hemocultivo es demasiada.

Además de poder obtener la cantidad, hay que esperar 3 ó 4 días para el resultado, sin empezar la mayoría de las veces, la terapéutica para el paciente, con nefastos resultados en muchas ocasiones.

Se puede especular con las comparaciones hechas y los resultados obtenidos, el estudio pudiera tener valor pronóstico además de diagnóstico.

CAPITULO V

CONCLUSIONES

- 1.- Los pacientes positivos comprobados fueron los que mostraron los rasgos morfológicos como son vacuolas, granulaciones tóxicas y cuerpos de Döhle al realizar la biometría (esto fue con más anticipación al cultivo)
- 2.- Los resultados pueden dar la facultad, en un momento dado de ser pronósticos e incluso podrían permitir la revaloración o confirmación de la terapéutica.
- 3.- El método resulta accesible en cualquier laboratorio donde se realicen biometrías hemáticas y no es costoso.
- 4.- El resultado se obtiene en unas horas lo que le da ventaja sobre los cultivos que requieren incubación y observación a veces hasta por tres días mínimo.
- 5.- El estudio no tiene limitaciones y nos puede ayudar en la orientación sobre una sepsis; hay que aclarar que una alteración por sí sola no indica que se trate de una sepsis, con seguridad.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- John B. Miale, Laboratory Medicine Hematology, Editorial Mosby, pág. 658-676, USA 1990 6ª Edición.
- 2.- Alex C. Sonnenwirth; METODOS Y DIAGNOSTICO DEL LABORATORIO CLINICO, Editorial Médica Panamericana, 8ª Edición pág. 581-663, Buenos Aires, 1983.
- 3.- Wintrobe, Maxwell, Harrison; MEDICINA INTERNA, Editorial Interamericana, pág. 85-92, 7ª Edición, México 1989.
- 4.- Nathan, David G, Frank A. Oski; HEMATOLOGY OF INFANT AND CHILDHOOD, Editorial Sanders, 3ª Edición, Philadelphia 1987.
- 5.- Ledá Mizrahi Mograri, Roberto Felipe Lagunas; INDICE DE SEPTICEMIA EN EL LACTANTE. MANUAL DE DIAGNOSTICO Y TRATAMIENTO proporcionado por el Instituto Mexicano del Seguro Social. n° 6 pág 1173-1188, 1986.
- 6.- MANUAL DE PRACTICAS DEL LABORATORIO DE HEMATOLOGIA proporcionado por el Instituto Nacional de Pediatría, pág. 52-55, México 1990.
- 7.- D.Fried JMaytal, A.Hannkoglú; The differential leukocyte in shigellosis, Infection, 10 (17):13-14, 1982.
- 8.- Akarusa G. Keenan; Alteration of lymphocytes in childhood, Pediatrics, 54(26):38, 1974.
- 9.- Christine Lawrence, M.D.; Sheldon T. Brown, M.D.; Peripheral Blood seat bacillemia. Am.J.Med. 85(19): 111-113, 1988.
- 10.- James A Kellog; David A Bankert; Clinical microbiology and infectious diseases. Clin. Pharmacol Ther. 17(10): 104, 1975.
- 11.- Krause P.J.; Polimorfonuclear leukocyte heteroquireky in neonates and adults, Blood, 68(22):200, 1986.

- 12.- Christensen R.D.; Exhaustion of mature marrow neutrophils in neonates with sepsis, J.Pediatr. 26(16): 316-8,1980.
- 13.- Robert S. Galen; The normal range of granulocytes, Arch Pathol Lab Med, 101 (30): 561,1977.
- 14.- L.K. Sharma; Neonatal disease, Am. J.Dis.Child, 129 (70): 1183,1975.
- 15.- Congory J; Intussusception in infancy and childhood, Arch. Dis. Child, 47 (19): 747,1972.
- 16.- Marsh; Urinary tract infection and recurrent gastroenteritis Lclin Invest, 46 (20):1943-53, 1967.
- 17.- Christensen; Causes of perinatal and neonatal deaths, J. Pediatr. 26(72):316-8,1980.
- 18.- Andersen D.C., Sepsis high infant mortality and analysis based on prospective study, J. Pediatr. 85 (62) 420-6,1974.
- 19.- Christensen; Acute respiratory infections in children, Pediatr Res. 19 (82); 1278-82,1985.
- 20.- Siegel; Clinical characteristic of sepsis, N. Engl. J. Med. 304 (40): 642-7, 1981.
- 21.- Feinstein; Activity of neutrophilic granulocytes of patients with infection, Clin. pharmacol Ther. 17:104, 1975.
- 22.- Richard E. Sherman; The leukocyteleft shift in clinical and experimental sepsis, J. Pediatr. 18 (2):101-5, 1990.
- 23.- Cheng Hurt Liu M.D.; Carol Lahan; Degenerative changes in neutrophils; An indicator of bacterial infection, Pediatrics, 74 (5): 823-827, 1984.
- 24.- Philip D. Zieve, M.D.; Mansour Haghshenas M.D.; Vacuolization of the neutrophil, Arch Intern Med. 118(19): 356-357, 1966.
- 25.- Richard E Bohman; Fetal and neonatal medicine, The Journal of pediatrics, 95 (1):89,1979.

- 26.- C.C. Zielinski; R Ahmad; Mechanism of leucocyte locomotion in infection, Infection, 10:13-14, 1982.
- 27.- Gerald L. Mandell; Placze K.M.M.; Phagocytic cells in host defense against infections, Archives Disease in Child, 58:728/31, 1983.
- 28.- Cairo et al.; Granulocyte transfusions vs immunoglobulin therapy for neutropenia and sepsis, Pediatrics, 62:744, 1978.
- 29.- Christensen; Factors associated with infection and sepsis, J. Pediatr. 98:101, 1981.
- 30.- Phillip; Garofalo; Eosinophil degranulation in respiratory tract during infection, J. Pediatr., 98:795, 1981.
- 31.- Bainton D.E.; Bacteriology of acute otitis media, J. Exp. Med., 134:907-34, 1971.
- 32.- Christensen; Leukocyte response to infections in children with neutropenia, Pediatr. Research, 14:806, 1980.

APENDICE

PREPARACION DEL COLORANTE.

- 1.- En un mortero colocar las sales y el colorante, triturarlos con algunos mililitros de metanol; agregar el glicerol y disolver la mezcla en un litro de metanol.**
- 2.- Filtrar antes de utilizar.**