UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE LABORATORIO DE DIAGNOSTICO EN SALUD
(SELADIS)

"OPTIMIZACION DEL TEST DE HAM, TEST DE SUCROSA Y TEST DE AUTOHEMOLISIS Y OBTENCION DE RANGOS DE REFERENCIA EN NUESTRO MEDIO"

TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TITULO DE ESPECIALISTA EN DIAGNOSTICO EN SALUD
MENCIÓN: HEMATOLOGÍA

POSTULANTE: LIC. WANDALLY FATIMA MERCADO ARISPE
ASESOR: DR. ELIAS ISRRAEL ASBUN

LA PAZ – BOLIVIA
2007

AGRADECIMIENTOS

Doy gracias a Dios por darme la vida y la oportunidad de Ser mejor.

A mis padres, hermanos por ser quienes siempre están a mi lado con su amor y apoyo constante para permitirme culminar con mis sueños y metas.

Un agradecimiento especial la Doctora Patricia Gómez por ser una persona de grandes valores humanos, cuya enseñanza desinteresada es invaluable y además por su apoyo y asesoramiento en el presente trabajo.

A la Doctora Mónica Guzmán cuyo apoyo en el trabajo es imponderable, para llegar a culminar con el mismo dotándome de muestras.

A la Doctora Jacqueline Calla por Su valiosa y desinteresada ayuda en la realización de este trabajo, pues sin ella el trabajo no sería igual.

A mis docentes por transmitirme sus conocimientos.

A mis queridos amigos, compañeros y personal de SELADIS, por su amistad cariño y apoyo a través del tiempo.

DEDICATORIA

A mis amados Padres Lauro y Virginia, a mis queridos hermanos Johvanny, Ximena, Edy, Fresia, Mildreth y Laura, a Vladimir, Ignacio y Druzhba quienes son mí razón de vivir por ser ellos quienes con su amor y compresión hacen que mis sueños se hagan realidad.

I.-INTRODUCCIÓN

La anemia es la disminución del número de glóbulos rojos o de la cantidad de hemoglobina de la sangre. Los glóbulos rojos ó eritrocitos son células capaces de transportar oxigeno a los tejidos; por ello, cuando están reducidos se produce un déficit de aporte de oxígeno a las células, provocando síntomas diversos.

Los eritrocitos se forman en la médula ósea pasando luego a la corriente sanguínea donde vivirán unos 120 días, después de este tiempo y en condiciones normales, los eritrocitos comienzan a deteriorarse y son captados por el bazo donde se destruyen. (3)

Los valores críticos en el número de hematíes o en la cantidad de hemoglobina a partir de los cuales se habla de anemia varían en función del sexo y la edad principalmente. En términos generales, se considera anemia en el género masculino una cifra de glóbulos rojos por debajo de 4. 500.000 por mícrolítro o una cantidad de hemoglobina menor de 14 gr/dl, en el género femenino se considera anemia cuando los hematíes son menores de 4.000.000/mcrl y hemoglobina menor de 12 gr/dl (7).

Cuando existe anemia, en el cuerpo humano se ponen en marcha toda una serie de mecanismos que intentarán suplir las funciones que no se realizan como consecuencia de la disminución de aporte de oxígeno a los tejidos. Por esta razón se observa lo que denominamos como síndrome anémico cuando la demanda de oxígeno por los tejidos excede a la capacidad productora de eritrocitos, por la médula ósea. Las causas de este hecho son múltiples, y no existe relación entre gravedad y causa.(4m La anemia hemolítica es un trastorno en la que los glóbulos rojos sufren una destrucción prematura es decir antes de los 120 días por diversos mecanismos.(5)

Este tipo de anemia puede ser de origen Intrínseca llamada también intracorpuscular, la cual se produce por un defecto eritrocitario, ya sea metabólico o estructural. Son congénitas y la hemólisis en general es crónica.(4)

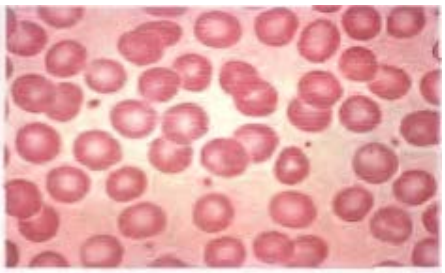
La extrinseca o extracorpuscular se producen por alteraciones plasmáticas que inciden sobre la membrana del glóbulo rojo (en general anticuerpos) o alteraciones vasculares que producen fragmentación mecánica de los hematíes. Pueden estar determinadas por otros mecanismos, como acción directa de gérmenes o agentes físicos sobre los eritrocitos. Son adquiridas y la hemólisis aguda es característica de estos procesos.

Por todo lo anterior, a la hora de estudiar la anemia, será decisivo para el Diagnóstico y tratamiento las pruebas de laboratorio que nos informarán sobre el número de glóbulos rojos, la concentración y cantidad de hemoglobina, la forma de los hematíes y el recuento de reticulocitos. Otros parámetros como la bilirrubinaindirecta, prueba de Coombs, fragilidad osmótica, electrocromatografía, La biopsia de medula ósea completará los estudios dando información sobre el estado de la misma y las técnicas del presente trabajo que han sido estandarizadas en nuestro medio como son la Prueba de Ham, el Test de sucrosa y la prueba de Autohemólisis que van a coadyuvar en el diagnostico real y útil de la anemia hemolítica para el galeno.(4)

11. MARCO TEORICO

11.1. ERITROCITO

Los glóbulos rojos denominados también hematíes o eritrocitos, son células de forma discoidea y bicóncava con un diámetro promedio de 7,5 pm y un espesor que llega a 2 um en sus bordes y que no alcanza 1 pm en el centro y constituyen el del total de células en la sangre, son componente esencial de la sangre. Esta célula toma la molécula de oxígeno al paso de la sangre por los pulmones y la transporta a tejidos distantes que dependen de oxigeno para la producción de energía y su supervivencia ([14])



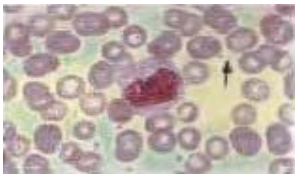
Fotografia 1. Eritrocitos normales, obtenida en el laboratorio de Hematobgiade SELADIS

El cuerpo regula cuidadosamente la producción y supervivencia normal de los glóbulos rojos, los cuales dependen de un correcto funcionamiento de muchos órganos y de un adecuado aporte nutricional de ciertas vitaminas y hierro.(22)

11.1.1. ESTRUCTURA Y FUNCION DEL ERITROCITO

El volumen del hematíe es de 85 a 90 fl y su área de superficie es de aproximadamente 140 u2 lo que le confiere la propiedad fundamental, su deformabilidad, tiene un espesor diferente en la zona central y en la periferia. El exceso de área de superficie es el diseño que permite la optimización del área de contacto para el intercambio de gases y facilita el

proceso de "empaquetamiento", o formación de las llamadas pilas de monedas, para optimizar el tránsito a través de los capilares sanguíneos, estructura que posee un diámetro menor al de los
eritrocitos (14,21 ,22)



Fotografía tomada en el Lab. de Hanatolmia del SELADIS

El eritrocito, sobrevive aproximadamente 120 días en la circulación cumpliendo de esta manera con su función transportadora de hemoglobina, antes de ser destruido en el sistema retículo endotelial.([14]'212[2])

La actividad metabólica del eritrocito disminuye con la edad, el agotamiento de sus sistemas enzimáticos altera la integridad de las células y su longevidad. Cerca de 1/120 del número total de eritrocitos circulantes se destruyen y producen diariamente. ([25])

Los eritrocitos carecen de núcleo y mitocondrias, pero están constituidos por una membrana celular y un contenido compuesto por hemoglobina y varios sistemas enzimáticos que poseen, les permiten cumplir a cabalidad sus funciones.(24)
Las principales funciones que cumple el eritrocito son:

- Transportar oxígeno hacia los tejidos
- Producir 2,3 difosfoglicerato para modificar la actividad de la hemoglobina
- Proteger el hierro y la hemoglobina del proceso de oxidación

- Mantener la estabilidad osmótica a través de la actividad de las bombas de membrana dependientes de ATP.
- Neutralizar sustancias oxidantes que pudiesen lesionar la membrana citoplasmática

La membrana eritrocitaria es una sofisticada estructura que junto al citoesqueleto tiene cuatro tipos de componentes: doble bicapa de lípidos unida a un intrincado esqueleto de proteínas transmembrana, la espectrina enrejada formada por unidades funcionales de tetrámeros de dos alfa espectrina y dos cadenas de beta espectrina. Y las proteínas de unión que ligan la espectrina entre si y a las proteínas transmembrana corno la actina, aducina, ankirina las cuales mantienen la forma bicóncava de la célula y le brindan extraordinaria plasticidad y deformabilidad. De otra parte, la red de proteínas cumple funciones metabólicas dadas por la presencia de canales y bombas iónicas encargadas de mantener el gradiente osmótico. Así mismo, en la membrana se anclan las proteínas de los grupos sanguíneos (figura1).

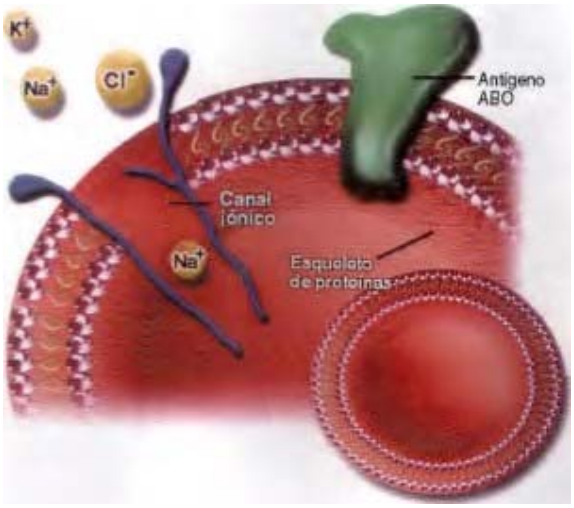


FIGURA 1. La membrana del eritrocito esta compuesta por una bicapa lipidica unida a una intrincada red de proteínas que le sirven de esqueleto que le brindan gran plasticidad y deformabilidad

El eritrocito deriva la mayor parte de la energía que requiere para su funcionamiento del metabolismo de la glucosa, por la vía glicolítica de EmbdenMeyerhof, que genera lactato y 2 moléculas de ATP a partir de una de glucosa, así como difosfoglicerato, sustancia primordial para la regulación de la curva de disociación de la hemoglobina y el oxígeno.

Las enzimas eritrocitarias ATP-asas intervienen en el funcionamiento de la bomba de Na+ - K+ que regula el equilibrio iónico de sodio y potasio entre el interior y exterior del hematíe, la síntesis de glutatión y el equilibrio lipidico de la membrana. La G6PD interviene en la glicólisis anaerobia. Que es el principal sistema metabólico del hematíe y único productor de ATP, la P5' nucleotidasa en la degradación de RNA durante la maduración eritrocitaria y la diaforasa en el mantenimiento del hierro de la hemoglobina en su estado reducido, ([23])

11.1.2 HEMOGLOBINA

La hemoglobina es el pigmento respiratorio de la sangre, está contenida exclusivamente dentro de los eritrocitos y se une aproximadamente al 97% de todo el oxigeno en el cuerpo. Es una proteína conjugada formada por la globina, un grupo hem y un átomo de hierro. (14)

11.1.2.1 ESTRUCTURA Y FUNCION DE LA HEMOGLOBINA

La hemoglobina es una heteroproteína de la sangre, de peso molecular 68.000, de color rojo característico, que transporta el oxígeno desde los órganos respiratorios hasta los tejidos. La forman cuatro cadenas polipeptídicas (globina) a cada una de las cuales se une un grupo heme, cuyo átomo de hierro es capaz de unirse de forma reversible al oxígeno.
Cuando la hemoglobina está unida al oxígeno, se denomina oxihemoglobina o hemoglobina oxigenada, dando el aspecto rojo intenso característico de la

sangre arterial. Cuando pierde el oxígeno, se denomina hemoglobina reducida, y presenta el color rojo oscuro de la sangre venosa. (25)

Existen diferentes tipos de hemoglobina entre las cuáles tenemos:(24)

Hemoglobina A o HbA es llamada también hemoglobina del adulto o hemoglobina normal, representa aproximadamente el 97% de la hemoglobina sintetizada en el adulto, formada por dos globinas alfa y dos globinas beta.

Hemoglobina A2: representa menos del 2,5% de la hemoglobina después del nacimiento, formada por dos globinas **alfa** y dos globinas delta.

Existen otro tipo de hemoglobinas que son la hemoglobina fetal, hemoglobina de Gower 1, hemoglobina de Gower2 y la hemoglobina Portland (24)

11.3. HEMOLISIS

Se considera hemólisis a la destrucción de hematíes, por diferentes causas entre ellas tenemos:

11.3.1 HEMÓLISIS INTRAVASCULAR

En la hemólisis intravascutar al eritrocito se le destruye dentro los Vasos sanguíneos, la hemoglobina sale al plasma donde se une a la haptoglobina que la transporta en forma de complejo al hígado, donde sé metaboliza a bilirrubina indirecta y excreta a la luz intestinal por el conducto biliar. (5)

Normalmente la concentración de hemoglobina libre en plasma menor de 5 mg /100ml, sin embargo en la hemólisis intravascular profusa, la

haptoglobina se agota y fa hemoglobina libre se acumula en el plasma, en este caso es posible que la síntesis de haptoglobina sea insuficiente para reemplazar a la que se usa, dando por resultado una disminución o la ausencia de haptoglobina en el plasma.([6])

Otra proteína plasmática, hemopexina toma su lugar y forma un complejo en el plasma con el heme, este es depurado en el plasma por el hígado, con mayor rapidez que la síntesis de hemopexina y esta se agota también, no obstante una disminución de la hemopoxina es secundaria a la reducción de haptoglobina.

La hemoglobina unida a la haptoglobina o hemopexina forma complejos que son grandes para pasar a través del glomérulorenal (5,14,21)

Cuando las dos proteínas de transporte se agotan, la hemoglobina libre, circula en el plasma, parte de esta la elimina el hígado en forma directa, parte se disocia en dímeros de tamaño adecuado para que los filtre el glomérulo, la hemoglobina filtrada se puede reabsorber en el túbulo proximal renal, pero cuando la velocidad de filtración excede la capacidad de resorción tubular, la hemoglobina libre aparece en la orina de acuerdo al grado de hemólisis, algunas células tubulares se saturan con el hierro de la hemoglobina y cuando se desprenden pasan a la orina.(6,10)

Los eritrocitos deben estar gravemente lesionados para experimentar destrucción intravascular. A células con lesión mínima o moderada las remueven los fagocitos esplénicos o hepáticos. La hemólisis intravascular la puede causar:

1. Activación del complemento sobre la membrana eritrocitaria.
2. Traumatismo físico o mecánico al eritrocito.
3. Presencia de sustancias toxica solubles en el medio ambiente eritrocitario.

II.3.2. HEMÓLISIS EXTRAVASCULAR

Si la destrucción eritrocitária prematura se debe a hemólisis extravascular, a las células la retiran de la circulación los fagocitos de bazo, hígado o médula ósea. No hay hemoglobinemia, hemoglobinuria ni hemosidenuria ya que la hemoglobina no se libera al plasma en forma directa, Si no que se degrada dentro del fagocito a sus componentes heme y globina, el heme libera hierro que se reutiliza y la molécula de protoporfirina se degrada hasta biliverdina y monóxido de carbono, luego la biliverdina pasa al plasma como bilirrubina se une a la albúmina y la excreta el hígado. ([14])

El bazo es más eficiente para retirar eritrocitos con lesiones pequeñas, debido al patrón único de circulación en los cordones esplénicos. El flujo sanguíneo hepático excede al bazo y es un sitio importante de retiro y fagocitosis de eritrocitos con daño extenso. Los eritrocitos sensibilizados por complemento e IgM, se eliminan con facilidad por los macrófagos hepáticos que tienen receptores para C3b. ([1] 8)

Por otra parte los eritrocitos sensibilizados con IgM sin adherencia de componentes del complemento, sobreviven al parecer de manera normal, ya que los macrófagos hepáticos carecen de receptores para la fracción fc de la IgM. Por lo tanto, la depuración de células sensibilizadas por IgM depende por entero de la activación del complemento, los eritrocitos sensibilizados por IgG se pueden activar o no por el complemento, ya que captan numerosas moléculas de IgG en su superficie, que pueden unirse a una molécula de complemento, estas células sensibilizadas se remueven por los macrófagos aún en ausencia de complemento.

A los eritrocitos sensibilizados con IgG los depuran rápidamente en forma primaria fagocitos esplénicos que tienen receptores fc para IgG además de receptores C3b. (15)

Los sitios y el grado de hemólisis extravascular dependen de la clase de anticuerpo adherido al eritrocito y de la presencia o ausencia de complemento, los macrófagos de la medula ósea se encargan de eliminar las células precursoras en proceso de maduración que tienen anormalidades intrensicas. Las anomalías en la maduración nuclear o citoplasmática que ocasionan este tipo de hemólisis son una causa de una tasa elevada de eritropoyesis ineficaz (1623)

Sin embargo, un número importante de células defectuosas pasa a la sangre periférica. Estas no se equipan en sus características fisiológicas para soportar las vicisitudes de la circulación y pronto las lesionan por lo que las remueven macrófagos esplénicos.

11.4. CLASIFICACIÓN DE LAS ANEMIAS HEMOLÍTICAS

Las anemias hemolíticas pueden clasificarse de acuerdo con la causa que acorta la supervivencia del eritrocito en:

11.4.1. ANEMIA HEMOLÍTICA HEREDITARIA

11.4.1 .A. DEFECTOS EN LA MEMBRANA DEL ERITROCITO

1. Esferocitosis
2. Eliptocitosis
3. Acantocitosis
4. Estomatocitosis

11.4.1 .B. CAPACIDAD LIMITADA PARA LA SÍNTESIS DE CADENAS NORMALES DE LA HEMOGLOBINA

1. Talasemias
2. Hemoglobinopatías

11.4.1.C. DEFICIENCIAS ENZIMÁTICAS DEL ERITROCITO

1. Deficiencia de piruvatoquinasa
2. Deficiencia de gJucosa-6-fosfato deshidrogenasa

11.4.2. ANEMIAS HEMOLITICA ADQUIRIDA

11.4.2.1 INMUNOLOGICAS

A. Anemia hemolítica aloinmunitaria.
B. Anemia hemolítica autoinmunitaria.

1 Anemia hemolítica por anticuerpos calientes
2. Anemias hemolíticas por anticuerpos fríos

11.4. 2. ANEMIAS HEMOLITICAS INDUCIDAS POR DROGAS

11.4.2.3 ANEMIAS HEMOLITICAS MICROANGINOPATICA

11.4.2.4 ANEMIAS HEMOLITICAS TRAUMATICA

11.4.2.5 HEMOGLOBINURIA PAROXISTICA NOCTURNA

11.4.1. ANEMIA HEMOLITICA HEREDITARIA POR DEFECTO INTRÍNSECO O INTRACORPUSCULAR.

A. DEFECTOS EN LA MEMBRANA

A.1. Esferocitosis Hereditaria o enfermedad de Minkowski-Chauffard

Denominada también anemia esferocitica, ictericia hemolítica congénita, ictericia familiar crónica, esplenomegalia y hemolítica. Es una enfermedad hereditaria conocida de carácter mendeliano dominante, aunque en algunos el mecanismo de transmisión parece ser autonómico recesivo. su expresividad hematológica más destacada es la alteración morfológica eritrocitaria caracterizada porque sus eritrocitos son estéricos y pequeños, muy frágiles, La excesiva hemólisis se debe a un defecto intrínseco del eritrocito que forma microesferocifos por un aumento del diámetro transversal a expensas del longitudinal sin modificación del VCM (24)

La mayoría de la esferocítósis hereditaria se asocia, con disminución de espectrina, a menor especirina menor él número de enlaces que salen del eje y más grandes los orificios de la red, debilitan el citoesqueleto y parece ser la base para la pérdida selectiva de los lípidos de la membrana que originan la conversión progresiva del eritrocito en esferocito.

El defecto molecular determinado por ausencia de espectrina, ankirina y proteína de la banda 3 parece ser una mutación en el gen de la ankirina que afecta el sitio de ligar la espectrina y su deficiente unión en el citoesqueleto permitiendo la proteólisis posterior. El defecto molecular, la mutación en el gen de la ankirina, a pesar de que la cantidad de ankírína es normal y esta disminuida la espectrina. Se ha demostrado que el defecto radica en la proteína de la membrana en los microfilamentos estructurales que permiten

la entrada excesiva de sodio, el cual a su vez, activa el sistema enzimático latente de la adenosina trifosfato, el cual provee energía suficiente para bombear al exterior el exceso de sodio intracelular.

La adenosina trifosfato, que resulta no solo provee energía para el transporte activo del catión sino que libera adenosina difosfato y fosfato inorgánico los cuales estimulan la glicólisis y hacen regenerar más ATP, cuando la producción de energía es deteriorada o cuando el eritrocito sufre estrés metabólico el sodio se acumula intracelularmente retiene agua y se convierte en esferocito el cual es atrapado y destruido en el bazo.

A.2. Eliptocitosis Hereditaria

Se hereda como un carácter dominante autonómico con penetración completa, excepto un tipo melanesiano muy poco frecuente, que se hereda como carácter recesivo. La forma eritrocitaria anormal en la eliptocitosis hereditaria es consecuencia de un defecto en el citoesqueleto membranal. (15.22)

Cada uno de estos defectos puede conducir a cambios esqueléticos que pueden hacer que la célula cambie a la forma elíptica y se fragmente bajo las exigencias de la circulación. ([22])

A.3. Acantocitosis

Los hematíes en la acantocitosis congénita se caracterizan por presentar en su superficie espículas de distinta longitud irregularmente distribuidas, caracterizado

por retardo en el crecimiento esteatorrea y enfermedad neurológica progresiva en la sangre se observan acantocitos. 116)

En la abetalipoproteinemía hereditaria enfermedad rara transmitida por carácter autonómico recesivo y se acompaña de un descenso de lipoproteínas de baja y muy baja densidad con la consiguiente disminución del colesterol y fosfolipidos plasmáticos. ([6])

A.4. Estomatocitosis Hereditaria

Es una enfermedad hereditaria, en la cual los hematíes o glóbulos rojos son estomatocitos que en lugar de depresión pálida circular central tiene una banda pálida central que Jes da aspecto de boca.(22)

La característica común es el aumento primario de la permeabilidad pasiva de la membrana eritrocitaria a los cationes sodio y potasio. Cuando predomina el aumento de la permeabilidad pasiva al sodio aumenta el contenido cationico y acuoso eritrocitario.([22])

B. CAPACIDAD LIMITADA PARA LA SíNTESIS DE CADENAS NORMALES DE LA HEMOGLOBINA

B.1. Talasemias

Bajo el nombre de "talasemia" se incluyen un grupo muy heterogéneo de alteraciones congénitas cuya característica común es un defecto en la síntesis de una o varias cadenas de globina normales. La disminución de la síntesis de cadenas alta se denomina alfatalasemia, la de cadenas beta, betatalasemia, la de cadenas delta y beta simultáneamente, delta-betatalasemia, y así sucesivamente.

La herencia de la talasemia muestra un patrón autosómico dominante y su frecuencia dentro del conjunto de la población mundial es muy elevado presentando una distribución que se correlaciona con las zonas donde existe o ha existido paludismo endémico. Ello obedece al efecto protector que frente al parásito ejerce la hemoglobinopatía, lo que significa una expresión genética positiva de ésta sobre la población afectada.

B.2. Hemoglobinopatías

Las hemoglobinopatías son alteraciones cualitativas de la globina, secundarias a mutaciones genéticas, cuya consecuencia puede ser una modificación estructural o una disminución de la síntesis de una cadena globínica estructuralmente normal.

C. DEFICIENCIAS ENZIMÁTICAS DEL ERITROCITO

C.1. Deficiencia Congénita de 6-fosfatodeshidrogenasa

La deficiencia de G6PD es la eritroenzimopatía mas frecuente con carencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en la sangre, que puede causar un tipo de anemia conocida como anemia hemolítica. Los glóbulos rojos transportan oxígeno al cuerpo y la G6PD protege estas células de los productos químicos naturales del oxígeno que pueden acumularse, La deficiencia de G6PD es hereditaria (las personas nacen con la deficiencia). [15]

Se acompaña además de un acusado polimorfismo genético, que es expresión de múltiples mutaciones de un gen situado en el cromosoma X .Los genes codifican todos nuestros rasgos, por tanto está ligada al sexo y a la expresividad clínica, es propia de los individuos homocigotos y los heterocigotos. Las portadoras poseen dos poblaciones de células, una normal y otra deficiente en G6PD, la enfermedad es heterogénea con deficiencias en la gravedad entre razas y sexos, el cromosoma X es transmitida por la madre, es decir si ella transmite este cromosoma a la mitad de sus hijos si es a un varón este será deficiente en 6-fosfodeshidrogenasa y las

hijas que reciban este gen serán portadoras, la otra mitad de hijos será normal no tendrá ningún problema genético.

C.2. Deficiencia de piruvatocinasa

Es la deficiencia más común en la vía de Embden-Meyerhof y la segunda deficiencia enzimática más frecuente en los eritrocitos. La herencia es recesiva autosómica, las anemias hemolíticas por deficiencia de piruvatocinasa, se limitan a homocigotos o heterocigotos dobles para dos enzimas mutantes.

La pituvatocinasa cataliza la conversión de fosfoenolpiruva20 a piruvato con producción de ATP, en la deficiencia de esta enzima, esta reacción productora de energía no se efectúa y por lo tanto, se pierde más moléculas de ATP por mol de glucosa catabolizada. La incapacidad del eritrocito para producir cantidades normales de ATP altera su membrana, permitiendo la perdida de potasio y deshidratación denominado equinocito, este es menos deformable y aumenta su secuestro y fagocitosis en los cordones esplenicos.

11.42. ANEMIA HEMOLÍTICA ADQUIRIDA

11.42. A. Anemia Hemolítica Inmunitaria

Todas las anemias hemolíticas adquiridas tienen su origen extracorpuscular. Son trastornos adquiridos en los cuales la destrucción de los eritrocitos se hace por medio de uno o más componentes del sistema inmune.
Esta se causa por anticuerpos reactivos contra membranas normales o alteradas de eritrocitos. En forma espontánea, los anticuerpos antieritrocitos se originan en anemias hemolíticas autoinmunitaria o su formación se inicia por agentes exógenos como fármacos o sustancias químicas. La anemia inmunohemolitica se clasifica con base en la naturaleza del anticuerpo que se involucra y quizá de los trastornos predisponentes acompañantes.

11.4.2. A1. Anemias Hemolíticas Aloinmunitarias

Esta anemia se genera cuando ocurren transfusiones sanguineas, donde los antígenos del receptor reconocen los anticuerpos del donador como extrañas y las van destruyendo produciendo lo que se denomina eritrocito alogénico.

11.42. A.2. Anemia Hemolítica Autoinmunitaria

En la anemia Hemolítica autoinmunitaria (AHAI) se desconoce el mecanismo de formación de anticuerpos en anemias hemolíticas autoinmunitarias, se dice que ocurren debido a un defecto en el mecanismo que regula la respuesta inmunitaria.

En forma normal, las células T supresoras inducen tolerancia a los autoantígenos por inhibición de la actividad de las células B productoras de anticuerpo. La perdida de este efecto en la célula supresora podría conducir a la formación de anticuerpos contra lo propio y así producir su destrucción.

11.4.2. A.2.1. Anemia Hemolítica Por Anticuerpos Calientes

La anemia es grave y puede ser mortal; la extensión de sangre periférica se caracteriza por esferocitosis y polícromatofifia con CHCM elevada En la AHAI mediada por anticuerpos calientes, la hemólisis ocurre principalmente en el bazo; la hemoglobinuria y la hemosiderinuria son muy raras. Si bien los anticuerpos pueden tener cierta especificidad, en virtud de que se dirigen contra un antígeno del sistema Rh, casi todos son panaglutininas, lo que dificulta la comparación cruzada. En algunos casos clínicos típicos, la antiglobulina directa es negativa debido a que el número de moléculas por superficie del hematíe es demasiado pequeño o bien a que la inmunoglobulina localizada en la superficie es de tipo IgA

11.4.2. A.2.2. Anemia Hemolítica Por Anticuerpos Fríos

La enfermedad por anticuerpos fríos por aglutininas frías, es una anemia hemolítica producida por autoanticuerpos que reaccionan a temperaturas inferiores a 37 9C, generalmente PC. Esta enfermedad se asocia a infecciones en especial.

1.4.2.3. Anemias Hemolíticas Inducidas Por Drogas

La hemólisis en la cual se fija el complemento que pueden producir anemia hemolítica como la quínina, quinidina, fenacetina, sulfas, etc. La droga se une a la proteína plasmática formando antígeno complemento, este complejo inmune formado se absorbe a la membrana del eritrocito, frecuentemente activa el complemento, produciendo hemólisis intravascular con hemoglobinemia,hemoglobinuria y daño renal.

11.4.2.4. Anemia Hemolítica Microangiopatica

Es un proceso hemolítico causado por lesiones en la microcirculación o por dispositivos prostéticos en el miocardio, anemia hemolítica cardiaca traumática.
Las lesiones microcirculación se encuentran en diversas enfermedades, incluyendo cáncer diseminado, eclampsia, preeclampsia, síndrome urémico hemolítico, púrpura trombocitopenica trombotica e hipertensión maligna.

1.4.2.5. Anemia Hemolítica Causada Por Lesión Física Al Eritrocito O Lesión Traumática

La anemia hemolítica causada por daño traumático a los eritrocitos en la circulación se caracteriza por hemólisis intravascular y anormalidad" del eritrocito, incluyendo fragmentos y células en casco.

1.4.2.6. Hemoglobinuria Paroxístíca Nocturna O Síndrome De Marchifava Micheli

La hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN), llamada también síndrome de Marchiafava-Micheli es un raro trastorno que se caracteriza por episodios de hemólisis y hemoglobinuria, deriva su nombre del patrón clásico de hemólisis intravascular irregular en hemoglobinuria nocturna, siendo ésta más acentuada durante el sueño. La HPN es más frecuente en varones alrededor de los 20 años, pero puede presentarse en ambos sexos a cualquier edad.

La HPN es un trastorno eritrocitario intrínseco, es adquirida y cJonal de las células progenitoras de la hematopoyesis. La clona anormal de células precursoras produce eritrocitos, plaquetas y neutrófilos que fijan cantidades masivas anormales de complemento.

Esta se debe a un defecto adquirido de la membrana que ocasiona una sensibilidad anómala al C3 plasmático normal. La lisis se presenta cuando el complemento se activa por anticuerpos por la vía alterna de ta properdina aumentando la efectividad lítica del factor 3 del complemento. ([19])

Este defecto es el resultado de la pérdida de proteínas de membrana secundaria a una alteración en el ancla de glicosil-fosfatidil-inositol, originada principalmente por un trastorno era su biosíntesis; el gen responsable se localiza en el cromosoma X y se denomina PIG-A. El defecto de la membrana es consecuencia de un único «golpe» en el gen; las manifestaciones clínicas Se producen por la carencia de proteínas que dependen del ancla de glicosjl-fosfatidil-inositol (GPI) para expresarse en la superficie celular.

Se produce por Lilia mutación en un gen del cromosoma X que codifica el GPI, grupo químico gracias al cual diversas proteínas se unen a la membrana celular, razón por la cual ciertas proteínas desaparecen de la membrana.

1) CD 55, que interviene en el control de la activación del complemento. Su defecto favorece (a acción citolitica del C3b activado.
2) CD 59, que inhibe la citolisis reactiva al complejo C5b-C8 del complemento,
3) CD 58, en la superficie de linfocitos y monocitos, y es un ligando de la molécula de adhesión CD2.
4) CD 16 de los neutrofilos.
5) UPAR, que se une a la urocinasa y activa al plasminogeno e inicia la fibrinolisis.
6) CD14 , de los monocitos , interviene en la respuesta a las endotoxinas.
7) Cdw52, en linfocito, Monocitos y Neutrofilos, responsable de la activación linfocitaria por CD2.
8) CD 24. en los linfocitos B inmaduros.
9) CD 48, Ag. pan-leucocitario .

IO) CD 66/CD67, inlervienen en la función granulocitaria .

El defecto básico se desconoce, pero es probable que se relacione con un defecto estructural o bioquímico de la membrana celular, el grado de hemólisis puede variar como resultado la proporción de células precursoras anormales debido a que casi siempre hay también una población de células normales, la clona anormal. Puede aparecer después de la lesión o en forma espontánea.

La enfermedad comienza en forma insidiosa en la tercera o quinta décadas de la vida con episodios irregulares de hemólisis aguda acompañada de hemoglobinuria, la crisis puede desencadenarse por infecciones, administración de Fe, vacunas o la menstruación. Puede haber dolor abdominal y lumbar, junto con esplenomegalia, hemoglobinemia, hemoglobinuria y síntomas de anemia normocítica grave. La pérdida urinaria prolongada de Hb puede provocar un déficit de Fe, si bien algunos órganos, especialmente los riñones, pueden estar saturados de hemosiderina. Son frecuentes la leucopenia y la trombocitopenia. También es habitual la hemoglobinuria macroscópica durante las crisis y la orina puede contener hemosiderina. Los pacientes muestran fuerte predisposición a presentar episodios de trombosis arterial y venosa, que constituyen una causa frecuente de muerte.

11.5. PRUEBAS UTILIZADAS PARA EL DIAGNOSTICO DE ANEMIA HEMOLÍTICA

Los exámenes primarios que nos van ha dar la primera pauta de anemia son:

11.5.1.HEMOGLOBINA.- Es parte de la sangre que distribuye el oxigeno de los pulmones a los tejidos del cuerpo.

Se considera como anemia valores por debajo de 13 g/dl en mujeres y 15 mg/dl en varones.

11.5.2. HEMATOCRITO.- Es el porcentaje de glóbulos rojos que se encuentran en un volumen específico de sangre.

Se considera anemia por debajo de 42 g/dl en género femenino y 50 g/ dl en género masculino.

11.5. 3.RECUENTO DE RETICULOCITOS.- Los reticulocitos son hematíes que contienen restos de ARN que precipita en presencia de colorantes denominados Vitales. El número de reticulocitos en sangre es un reflejo del grado de actividad eritropoyetica medular osea.

Se tiene como valores de referencia den 0,2—2%. , en anemias hemolíticas el recuento de reticulocitos se encuentran con un valor mayor al 2 %.

Los exámenes que estudian la alteración de la membrana eritrocitaria son:

11.5.4. RESISTENCIA OSMÓTICA ERITROCITARIA

La membrana eritrocitaria es semipermeable, es decir, permite el libre paso de agua a su través, pero restringe e} de ciertos solutos iónicos. Debido a bajo cuando el hematíe se incuba en un medio de concentración iónica superior a la existente en su citoplasma, se produce por efecto osmótico un paso de agua desde el interior al exterior de la célula que condiciona su deshidratación. Por el contrario, si el medio tiene una concentración iónica inferior al hematíe, el agua atraviesa la membrana en un sentido contrario y el hematíe se hidrata.

Este paso de agua en uno u otro sentido, según la concentración iónica del medio se producirá hasta que se alcance el equilibrio entre ambos. Por ello los hematíes se incuban en un medio escasamente hipotónico, el equilibrio se alcanza a expensas de un aumento del diámetro transversal o grosor del hematíe que se transforma. Por el contrario, si la hipotonía del medio supera cierto límite se altera la permeabilidad de la membrana y el contenido macromolecular eritrocitario por lo que sobreviene una salida de la hemoglobina hacia e] medio o hemólisis. Cuando el medio posee hipotonía absoluta, se observa la hemólisis de la totalidad de los hematíes, pero cuando es relativa, existe siempre un determinado número de hematíes capaces de resistir el efecto osmótico. Esto explica que la hemólisis sea parcial y de

intensidad variable, según el número de hematíes resistentes. Se mide de acuerdo a la desviación que existe en cada tubo, realizando la curva esta no debe desviarse ni a izquierda ni derecha, esto demostraría un defecto y por tanto hemólisis.

11.5.5. TERMOESTABILIDAD DE LA MEMBRANA ERITROCITARIA

Esta prueba al calor se fundamenta en que la membrana del hematíe resiste normalmente a un aumento de la temperatura hasta de 492ºC, momento a partir del cual se desestructura y fragmenta dando lugar a la deformación del hematíe. En algunos casos excepcionales como la piropoiquilocitosis congénita en que el fenómeno citado tiene lugar a una temperatura de 450C, obedece a una alteración
estructural de la espectrina , por la cual la membrana eritrocitaria es más sensible a la acción del calor.

11.5.6. PERMEABILIDAD IONICA ERITROCITARIA

Existen algunos síndromes hemolíticos en los que la permeabilidad cationica de la membrana eritrocitaria es anormal, mediante la determinación de los flujos activos o pasivos de sodio y potasio junto con el análisis del contenido cationico y acuoso eritrocitario, pueden demostrarse alteraciones del transporte cationico debidas a defectos intrinsecos de la membrana eritrocitaria, siendo este el fundamento de la prueba.

11.5.7. ELECTROFORESIS DE HEMOGLOBINAS

Cuando se hace pasar corriente eléctrica continua a través de una solución que posea diferentes componentes cargados eléctricamente, estos podrán ser separados. La velocidad con que se separan de la solución, está en función, sobre todo, de la intensidad de la carga que posean. La hemoglobina por ser de naturaleza proteica, está constituida por aminoácidos, los cuales se unen entre si mediante enlaces peptídicos formando cadenas

secuenciales (globinas) que poseen radicales ácidos y básicos. La carga eléctrica depende del PH del medio en que están disueltos. En su punto isoelectrico la proteína es eléctricamente neutra, a medida que se eleva el PH, los radicales básicos van siendo neutralizados por la base del regulador del medio y predominan los radicales ácidos lo que confiere a la proteína una carga negativa, Si el PH es ácido, obviamente ocurre lo contrario.

Las diferentes hemoglobinas normales al igual que las proteínas del plasma, cuando se colocan en un medio a un determinado PH, presentan diferente carga eléctrica, por lo que pueden ser separadas debido a su distinta movilidad al aplicar un campo eléctrico.

Esta prueba puede ser directa o indirecta, las dos se fundamentan en la aglutinación.

Directa.- Se denomina así cuando se aplica a hematíes que han sido sensibilizados IN VIVO en el propio organismo del paciente (anemias hemolíticas, EHRN hematíes sensibilizados in vivo); es el caso de un bebe que tiene GR que son Rh positivos; si la madre esta sensibilizada el bebe tiene los Ac maternos unidos a GR, a estos los enfrento con suero de conejo anti gamma globulina humana y los GR se lisan o aglutinan. Se trabaja con GR sensibilizados.

Indirecta.- Pone de manifiesto la sensibilización de los hematíes que se ha producido IN VITRO con diferentes fines. Si se tiene presente el Ac (antiRh) en el suero de la madre que esta dirigido contra el Ag que se encuentra en los GR; posteriormente se le agrega anti gamma globulina humana, produciéndose la aglutinación.

Las pruebas estandarizadas recientemente en nuestro medio son:

11.5.9. TEST DE AUTOHEMOLISIS

Los hematíes mantienen su integridad molecular estructural y función hemoglobinica gracias a su escaso, pero suficiente, contenido en ATP, que obtienen exclusivamente a través de la glucólisis, es decir, de la oxidación de la glucosa a piruvato. Si por un defecto congénito del metabolismo disminuye la capacidad glucolitica del hematíe, el descenso del ATP producirá un acortamiento de su supervivencia o vida media y por tanto una hemólisis produciendo anemia hemolítica. Esta prueba a 379C tiene como finalidad poner en manifiesto la capacidad de tos hematíes para mantener su integridad in vitro después de un cierto tiempo de incubación a 379ºC frente a su propio plasma. esta incubación se realiza tanto en presencia como en ausencia de cantidades suficientes de glucosa al objeto de valorar las necesidades metabólicas de la célula en dichas condiciones. Por lo tanto se debe realizar las dos pruebas ya que ambas pruebas son complementarias para examinar el comportamiento del eritrocito.

Los rangos de referencia de este test a nivel internacional son de:

Prueba de autohemólisis sin adición de glucosa 0.2 a 2% .

Prueba de Autohemólisis con adición de glucosa 0.0 a 1.2%

Cuando los valores se encuentran por encima de los rangos se considera un paciente con anemia hemolítica.

La fórmula para la obtención en porcentaje para la autohemolisis es:

(Absorvancia 2- absorvancia3) x factor de dilución x 100 - Hto % de hemolisis
=----------

Hto x absorvancia[l] x factor de dilución de la sangre

11.5.10. PRUEBA DE HAM- DACIE

Denominada también prueba de suero acidificado, es una prueba donde los hematíes hemolizan cuando son incubados en presencia del propio suero compatible previamente acidificados. Esta enfermedad se conoce con el nombre de hemoglobinuria paroxística nocturna y en ella existe una alteración adquirida de la membrana eritrocitaria, por la que los hematíes presentan una sensibilidad anormalmente aumentada a la acción lítica del complemento. El complemento es una proteína del plasma que Se une al complejo antígeno anticuerpo, favoreciendo la lisis celular cuando dicho complejo se halla a nivel de su superficie. Esta acción lítica del complemento de la via alterna resulta favorecida por un descenso del PH o la fuerza iónica.

En los hematíes normales, la acción lítica del complemento no se desarrolla ni aun en presencia del suero acidificado. Pero en hematíes anormales hasta una pequeña disminución del PH del medio para que dicha acción se desarrolle y sobrevenga la hemólisis con anemia y hemoglobinuria.

Los valores de referencia a nivel internacional son de: hasta 1096 de hemólisis, en pacientes sin anemia y se considera mayor a positivo.

La fórmula para la obtención del porcentaje de hemólisis en esta prueba es:

$$\% \text{ de hemólisis} = \frac{\text{Absorbancía de ta muestra}}{\text{Absorbancia del 100\% de hemólisis}} \times 100$$

Esta fórmula se debe utilizar en los seis tubos e interpretarlos. Al realizar esta prueba se debe tomar en cuenta también que si la hemólisis ocurre en el tubo contenido suero con complemento inactivado a 569ºC la prueba no es positiva para hemoglobinuria esto puede suceder debidos a los esferocitos o células sensibilizadas con anticuerpos siendo estos los responsables normalmente en este tubo la hemólisis es 0% pues el mecanismo de acción es activando el complemento y a determinada temperatura este se inactiva , este nos va ayudar a ver si la prueba realizada esta correctamente realizada.

11.5.11. PRUEBA DE LA SUCROSA

Denominada también prueba de la sacarosa, este test se basa en la hemólisis de los hematíes en presencia de solutos de baja fuerza iónica como la sacarosa esta actúa fijando la proteína del complemento sericó, con lo que, si se trata de hematíes con problemas en la membrana eritrocitaria (hemoglobinuria paroxistica nocturna) con un poco de baja fuerza iónica, existe una hemólisis Por lo tanto se produce anemia, no así en glóbulos rojos normales. Sus valores de referencia a nivel internacional son de 5 a IO % de hemólisis, mayor a esta se considera anemia hemolítica, que se aplica para diagnosticar hemoglobinuria paroxistica nocturna.

La fórmula es:

$$\% \text{ de hemolisis} = \frac{\text{Absorbancia de ta muestra}}{\text{Absorbancia del 100\% de hemólisis}} \times 100$$

III. JUSTIFICACIÓN

La anemia es una de las condiciones mórbidas con más alta incidencia y prevalencia en todo el mundo, afectando personas de todas las edades y clases sociales, y a ambos sexos por igual.

Un análisis estadístico de las muestras procesadas en el instituto SELADIS el 2001 muestra que los casos de anemia (sin clasificar el tipo de anemia) en sujetos de género femenino llegaron a 26% y 18% en sujetos de género masculino, si bien la incidencia de personas con anemia hemolítica en nuestro país todavía no esta confirmado, la incidencia a nivel mundial es 4 de cada 100 personas.

El término anemia hace referencia no a un diagnóstico como tal, sino a un conjunto de signos y síntomas que tienen un origen común, el cual debe ser esclarecido en todos los caso antes de iniciar cualquier intervención terapéutica. Dadas las enormes implicaciones que éste padecimiento tiene no sólo sobre el desarrollo infantil y el rendimiento académico y laboral en jóvenes y adultos, sino sobre la salud general de la población afectada, es necesario que el médico de atención primaria preste particular atención a los factores de riesgo asociados a su aparición, así como a los síntomas y signos relacionados con su presencia Por lo tanto es importante determinar las causas de la anemia ya que estas pueden ser los primeros síntomas de una enfermedad grave.

Bolivia es un país de escasos recursos económicos, por lo cual se hace difícil el estudio de las diferentes patologías que afectan a nuestra población como es la anemia, si bien existen técnicas buenas para determinar anemia hemolítica como son la prueba de Coombs en anemia hemolítica autoinmune, y fragilidad osmótica en anemias esferociticas hereditarias, (que son realizadas en el laboratorio de Hematología e Inmunología del

instituto SELADIS) estas pruebas no son suficientes, puesto que todavía existen muchos otros tipos de anemia hemolítica a caracterizar.

Esta situación obliga a la optimización de nuevos métodos de diagnostico en nuestro medio que pongan en manifiesto modificaciones de algunas de sus propiedades física tales como ser su capacidad para resistir la hipotonía del medio, la agitación, la incubación , su sensibilidad a la acción lítica del complemento, por lo que se propone la estandarización de técnicas obteniendo rangos de referencia , además que sean de fácil ejecución y relativamente económicas para nuestro medio y principalmente cuyos resultados orienten al galeno en forma más precisa al diagnóstico de las diferentes anemias hemolíticas.

IV. OBJETIVOS

IV.I .OBJETIVO GENERAL.

Obtener rangos de referencia, estandarizando técnicas de fácil ejecución en nuestro medio

IV.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Estandarizar la prueba de Ham.
- Estandarizar el Test de Sucrosa.
- Estandarizar el Test de Autohemolisis.
- Obtener rangos de referencia para cada una de las pruebas
- Evaluar la aplicabilidad de estas pruebas procesando muestras sospechosas
- Correlacionar las diferentes técnicas estandarizadas

V. MATERIAL Y METODOS

V.I.POBLACIÓN

En la primera fase de estandarización de las técnicas propuestas la población en estudio estuvo constituida por 68 donadores aparentemente sanos, seleccionados de acuerdo a los siguientes criterios de exclusión e inclusión.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Pacientes de 15 55 años de edad aparentemente sanos
- Pacientes con hematocrito con un rango de 44 51 en mujeres y 5156 en varones.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Pacientes embarazadas
- Pacientes con infecciones bacterianas y virales
- Pacientes que estén cursando con alguna enfermedad crónica
- Pacientes desnutridos
- Pacientes con cuadros de inmunosupresión
- Pacientes en tratamiento con corticoides
-

Con objeto de establecer las pruebas estandarizadas se incluyó pacientes hospitalizados por diferentes causas de acuerdo a ocurrencia de casos en el hospital general en el consultorio de hematología, de acuerdo a los siguientes criterios:

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Pacientes con hematocrito bajo
- Pacientes con hemoglobina baja
- Pacientes con reticulocitos elevados
- Pacientes con bilirrubina indirecta elevada
- Pacientes con aparente hemólisis de glóbulos rojos

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Pacientes con un tipo de anemia establecida.

V.2. MUESTRA

La muestra sangre, fue obtenida por punción venosa recién extraída con y sin anticoagulante según la técnica, no se necesita estar en ayunas por lo tanto puede tomarse en cualquier momento, pero debe tratarse de evitar la ingesta de medicamentos para evitar resultados erroneos.

V.3 MATERIAL Y METODOS

V.3.1. HEMATOCRITO

- Tubos de microhematocrito
- Plastilina
- Centrífuga de microhematocrito
- Lector de microhematocrito

PROCEDIMIENTO:

Se Homogenizó la muestra de sangre, luego se llenaron por capilaridad los tubos de microhematócrito, en 2/3 a 3/4 partes de su capacidad, se sello el extremo inferior con plastilina. Posteriormente sé introdujo el tubo en la canaleta radial de la centrífuga de hematocrito por 5 minutos a IO 000 RPM, cuidando de que el extremo opuesto tenga contrapeso.
Inmediatamente, se realizó la lectura colocando el tubo capilar en el lector de microhematocrito.

RANGO DE REFERENCIA

MUJERES: 44-51 mg/ dl
VARONES: 49-52 mg 1 dl

Existe

Aumento en:

- Poliglobulia
- Policitemia Vera

Existe disminución en:

- Anemias
- Leucemias
- Hemorragias

V.3.2. HEMOGLOBINA

- Espectrofotómetro
- Solución de Drabkin
- Gradilla
- Tubos colectores de IO ml
- Pipetas de 50 IO ml - Micropipetas de 20 ul - Cubetas de plastico

PROCEDIMIENTO:

Se Coloco en el tubo colector la solución de Drabkin, luego se homogenizó la muestra de sangre tomamos con una micropipeta 20 ul se limpio cuidadosamente la punta y se virtio a la solución de Drabkin enjuagando hasta que no queden restos de sangre en el interior de la micropipipeta, se homogenizo y se dejo a temperatura ambiente 15 minutos en la oscuridad

después de ese tiempo se fue a leer en el espectrofotómetro a 540 nn de longitud y se realizo el cálculo correspondiente.

RANGO DE REFERENCIA

MUJERES: 13.5-16.45 g%
VARONES: 16.45- 16.81 g %

Existe aumento en:

- Poliglobulia
- policitemia Ver
-

Existe disminución en:

- Diferentes tipos de anemias
- Leucemias
- Hemorragias

V.3.3. TEST DE AUTOHEMOLISIS

- Solución de glucosa al 10%
- Solución de Drabkin
- Solución salina al 0,85%
- Pipetas graduadas estériles
- Matraces Erlemmeyer de 125 ml
- Perlas de vidrio
- Tubos de ensayo
- Espectrofotómetro

PROCEDIMIENTO:

Después de tomar la muestra se procedió de la siguiente manera: Se desfibrinó la sangre con perlas de vidrio, se marcaron 8 tubos y se colocaron en cuatro tubos sangre control y en otros cuatro sangre muestra. La sangre que resta se colocó en un tubo y se centrifugó a 2500 rpm por IO minutos, tanto del control como la muestra. El suero obtenido se separo en 2 tubos uno se guardo al refrigerador, y otro a temperatura ambiente. Sé pipeteó 0.1 ml de solución de glucosa al 10% en los tubos 3,4,7,8, se tapo y mezcló bien por inversión luego se incubo a 379C por 24 hrs, después nuevamente se mezclo suavemente y se incubo a 37 C por otras 24 hrs.
Luego de las 48 horas se combinó los tubos 1-2,3-4,5-6,7-8 y se mezcló bien. En un tubo se coloco 5ml de Drabkin y 0,02 ml de sangre del tubo numero 1 incubado previamente 48 hrs. Se hizo el cargado y la lectura del hematocrito por duplicado y guardamos nuevamente se centrifugo los cuatro tubos obtenidos a 2500 rpm y se separo el suero en tubos marcados.

Se coloco en otros tubos 5 ml de la solución de Drabkin y luego se agrego a estas el suero separado 0,5 ml de los sueros guardados, y de los incubados.

Finalmente se procedió a la lectura en el espectrofotómetro a 550 nm de longitud utilizando Drabkin como blanco.

RANGO DE REFERENCIA

Autohemolisis sin adición de glucosa: 0.46 - 1,81 %
Autohemolisis con adición de glucosa: 0.07 - 0.87 %

Valores aumentados

- Esferocitocis hereditaria
- Esferocitocis no hereditaria

V.5.TEST DE HAM

MATERIAL REACTIVOS Y EQUIPOS

- HCl 0.2 N
- CINa 0.850/0
- Solución de Drabkin
- Tubos de vidrio
- Perlas de vidrio
- Centrifugadora
- Estufa a 37C
- Pipetas
- Matraces Erlenmeyer

PROCEDIMIENTO

Se desfibrinó la sangre tanto control como muestra con perlas de vidrio teniendo cuidado de no hemolizar la muestra. Luego sé centrífugo y obtuvo el suero luego se coloco en un tubo 3 ml de suero control a 562ºC por 30 minutos y en seis tubos previamente marcados se coloco de la siguiente manera:

Nº DE TUBOS		2	3	4	5	6
SUERO CONTROL FRESCO	0.5 ml	0.5 ml			0.5 ml	0.5 ml
SUERO FRESCO MUESTRA			0.5 ml			
SUERO NORMAL GUARDADO				0.5 ml		
HCL 0.2 N	0.05 ml		0.05 ml	0.05 ml		0.05 ml
GLOBULOS ROJOS AL DE LA MUESTRA	0.05 ml	0.05 ml	0.05 ml	0.05 ml		0.05 ml
GLOBULOS ROJOS AL DEL CONTROL					0.05 ml	0.05 ml

Se mezclo e incubo cada tubo a 379 ºC por una hora, después se centrifugo a 2500 rpm 1O minutos. Se marcaron otros tubos Blanco, 100% de hemólisis y del 1 al 6 y después se colocó en cada uno 5 ml de Drabkin, y se agregó 0,5 ml de sobrenadante de cada número. Al 100% de hemólisis se colocó 0,9 ml de solución de Drabkin y 0,05 ml de glóbulos rojos del control al 50%, se hizo la lectura de cada tubo ene spectrometro a 540 nm de longitud con blanco Drabkin.

Se realizo los cálculos y se observo el grado de hemólisis en los tubos marcados.

RANGO DE REFERENCIA

Test de Ham = 0.87 - 1.64 %

Valores aumentados

- Hemoglobinuria Paroxística Nocturna
- Anemia aplasica.

V.6.TEST DE SUCROSA

MATERIAL REACTIVOS Y EQUIPOS

- Solución de Sucrosa al 9,24 %
- Solución de Drabkin
- Solución salina
- Centrifugadora
- Pipetas
- Espectrofotómetro
- Cubetas

PROCEDIMIENTO

Se procedió de la siguiente manera:

TUBOS MARCADOS		2	3	4
SUERO CONTROL	0.05 ml	Q05 m)		
SUERO MUESTRA			0.05 ml	0.05 ml
SOLUCION DE SUCROSA AL 9.24%	0,85 rnl		0.85 ml	
GLOBULOS ROJOS CONTROL AL	O. Irnl	0.1 mi		
GLOBULOS ROJOS DE LA MUESTRA AL			0.1 ml	0.1 ml

Se incubo a 379 C por 30 minutos. y centrifugo a 2500 rpm por 5 minutos. Luego en otros tubos se coloco 5 ml de Drabkin y se añadió 0,5 ml de sobrenadante. Al 100% de hemólisis se añadió 0,5 ml de solución de Drabkin y 0,1 ml de suspensión de células al 50% Se realizo la lectura al espectrofotómetro a 540 nm de longitud.

RANGO DE REFERENCIA

Test de Sucrosa = 1.01 - 1,90 %

Valores aumentados

- Hemoglobinuria Paroxistica Nocturna

VII. ANALISIS ESTADÍSTICOS

Los resultados obtenidos fueron analizados a través de:

- Determinación del promedio
- Desviación Estándar _ Coeficiente de variación

VIII. RESULTADOS

Los resultados obtenidos en una población aparentemente sana en una edad comprendida entre 15 a 55 años de acuerdo al método fueron los siguientes:

VIII.I. DETERMINACIÓN DEL RANGO DE REFERENCIA EN EL TEST DE AUTOHEMOLISIS

TABLA 1 . RANGOS DE REFERENCIA EN EL TEST DE AUTOHEMOLISIS SIN GLUCOSA

PROMEDIO	DESV. ESTANDAR	COEF. DE VARIACIÓN	R. EN BOLIVIA	R.REF_ A NIVEL MUNDIAL
1.34%	0.19	14.17	0.46-1_81 %	0.20-2.20 %

TABLA 2. RANGOS DE REFERENCIA EN EL TEST OE AUTOHEMOLİS CON GLUCOSA AL 10 %

PROMEDIO	DESV. ESTANDAR	COEE DE VARIACIÓN	B. REF. EN BOLIVIA	NBEF. A NIVEL MUNDIAL
0.36%	0.04	11.11	0.07.0.87 %	0.01 -0.90 %

VIII.2. DETERMINACIÓN DEL RANGO DE REFERENCIA DE LA PRUEBA DE HAM-DACIE.

TABLA3. RANGOS DE REFERENCIA EN EL TEST DE HAM.DACIE

PROMEDIO	DESV. ESTANDAR	COEF. DE VARIACIÓN	R. REF. EN BOLIVIA	R. REF. A NIVEL MUNDIAL
0,99%	0,15	15.15	0,87-1,64%	Menor a 5 %

VIII.2. DETERMINACIÓN DEL RANGO DE REFERENCIA DEL TEST DE SUCROSA

TABLA.4. RANGOS DE REFERENCIA EN EL TEST DE SUCROSA

PROMEDIO	DESV. ESTANDAR	COEF. DE VARIACIÓN	R. REF. EN BOLIVIA	R. REF. A NIVEL MUNDIAL
1.45%	0.26	17.90	1.01 – 1.90%	Menor 10%

VIII.4 DETERMINACION DEL TEST DE HAM, SUCROSA Y AUTOHEMOLISIS EN PACIENTES CON SOSPECHA DE ANEMIA HEMOLÍTICA.

Después de optimizar la prueba de Ham, de Sucrosa y autohemolisis en nuestro medio, fueron incluidos en este estudio pacientes con sospecha clínica de anemia hemolítica. Se obtuvo los siguientes antecedentes:

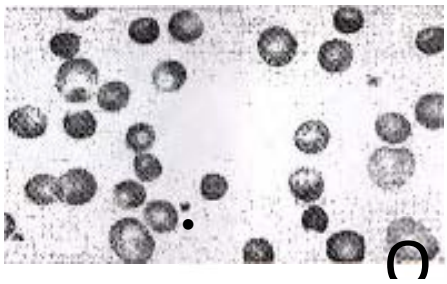
Caso1:

Historia de la enfermedad
EDAD: 25 años
SEXO: Femenino
Motivo de consulta: Control de rutina
Forma de inicio: Examen de rutina
Antecedentes médicos personales: Cirugía de Peritoneo 5 años atrás
Antecedentes familiares: De origen Asiático
Examen físico: No presenta sintomatología de ningún tipo aparentemente normal

Pruebas de Laboratorio

Prueba	Resultado	Rango de referencia
Hemoglobina	15.51 mg/dL	13.86-16.50 mg/dL
Hematocrito	47 mg/dL	42 — 50 mg/dl
Reticulocitos	2.3 %	0.5

Placa En los hematies observamos claramente esferocitos (fot. Nº 3),



Fotografía 3.Tomada en el Lab de Hematologia del Instituto SELADIS

Diagnostico final: Anemia hemolítica esferocitica Hereditaria no desencadenada.

Caso2:

Historia de la enfermedad
EDAD: 63 años
SEXO: Femenino
Motivo de consulta: Anemia Hemolítica
Forma de inicio: Insidioso
Antecedentes médicos personales: ,Artritis, Problema cardiaco, Anemia
Antecedentes familiares: Ninguno
Examen físico: Se encuentra en un estado de astenia, adinamia, pérdida de peso, poliuria y polidipsia
Medicación actual o reciente: Corticoides, amiodarona, hierro, antiinflamatorios

Pruebas de Laboratorio

Prueba	Resultado	Valores Normales
Hemoglobina	7.21	13.86-16.50 mg/dL
Hematocrito	22	42-50 mg/dl
Reticulocitos	8%	0.5 -2%

Placa: En este caso en el frotis se observan , Hipocromia, anisocitosis, esferocitos. Diagnostico final: Anemia Hemolitica autoinmune secundaria a medicamentos.

Caso3:

Historia de la enfermedad
EDAD: 34 años
SEXO: Masculino
Motivo de consulta: Hemoglobinuria Paroxistica Nocturna
Forma de inicio: Insidioso
Antecedentes médicos personales: Hemoglobinuria Paroxistica Nocturna determinada hace 5 años, pero no concuerda con la clínica.
Antecedentes familiares: Ninguno
Examen físico: Se encuentra en un estado de astenia, adinamia, pérdida de peso, poliuria y polidipsia
Medicación actual o reciente: prednisona 5 mg
Pruebas de Laboratorio

Prueba	Resultado	Valores Normales
Hemoglobina	4.5	13.86-16.50 mg/dL
Hematocrito	14	45-51 mg/dl
Reticulocitos	5%	0.5-2%

Y

Placa: En la serie roja se observa: Hipocromía, anisocitosis, poíquílocitosis, policromasia, 1 eritroblasto por 100 células nucleadas. Diagnostico final: Anemia aplasica.

Caso 4

Historia de la enfermedad
EDAD: 45 años
SEXO: Femenino
Motivo de consulta: Anemia
Forma de inicio: Insidioso
Antecedentes médicos personales: Lupus Eritematoso Sistémico
Antecedentes famifiares: Ninguno
Examen físico: Se encuentra en un estado de palidez, pérdida de peso,
Medicación actual o reciente: Corticoides

Pruebas de Laboratorio:

Prueba	Resultado	Valores Normales
Hemoglobina	2.5	13.86-16.50 mg/dL
Hematocrito	9	45-51 mg/dl
reticulocitos	13%	0.5-2%

Placa:En la serie roja se observa: Hipocromia, anisocitosis, policromasia, esferocitos

Diagnostico final: Anemia hemolítica Inmunitaria

A los pacientes también se les realizaron las siguientes pruebas y se obtuvieron los siguientes resultados:

	RET	P. COOMBS	DE F. OSMOTICA
Caso 1	N	----------	Desv. Lz
Caso 2	4	+	----------
Caso 3	4	----------	----------
Caso 4	4	----------	----------

Grafica I. Presenta resultados obtenidos en el estudio

A los Pacientes se les realiza las pruebas mencionadas recién presentadas con controles negativos (pacientes anteriormente estudiados) y se obtienen los siguientes resultados:

NP	DIAGNOSTICO PRESUNTIVO	TEST DE HAM-DACIE	TEST DE SUCROSA	TEST DE AUTOHEMOLISIS SIN GLUCOSA	TEST DE AUTOHEMOLISIS CON GLUCOSA
	Ex. de rutina	N	N	N	N
2	Anemia	4	4	4	4
3	HPN	N	N	N	N
4	Lupus	N	N	4	4

Grafica 2. Presenta los resultados obtenidos en las técnicas optimizadas

IX. DISCUSIÓN

En la tabla 3 y 4 de Ham-Dacie y Test de sucrosa se observa que el resultado obtenido es muy bajo en relación al internacional, pero debemos tomar en cuenta factores como son el clima, las condiciones de trabajo en las que se realizo las mismas.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos, las pruebas se validarían puesto que sus rangos son aceptables según el coeficiente de variación los mismos se encuentran en un rango inferior a veinte. que es el parámetro para la validación.

Las pruebas de Ham y Sacarosa han sido utilizadas de rutina en los laboratorios para el diagnóstico de HPN ya que pueden detectar eritrocitos que presenten alta sensibilidad a la acción lítica del complemento, aunque no siempre la prueba de Ham es lo suficientemente sensible y no refleja la verdadera proporción de células anormales. Por otra lado, la prueba de lisis por Sucrosa complementaria los resultados obtenidos.

La prueba de autohemolisis es una prueba confirmatoria para la determinación de esferocítosis hereditaria, por la acción de la glucosa en el ciclo de krebs, y teniendo gran importancia en el intercambio de energía del eritrocito en su membrana.(22)

En el primer caso patológico se ha demostrado que por los antecedentes y los resultados la paciente seria un cuadro de anemia hemolítica esferocitica hereditaria, por la desviación a la izquierda que presenta en la prueba de fragilidad osmótica realizada, además por la morfología de los eritrocitos en el frotis, estos por su forma esferocitaría, podría llegar a (lisarse antes de su vida media, sí bien no ha desencadenado una crisis es porque el mecanismo compensatorio que esta funcionando bien y esta se podría desencadenar en cualquier momento.([6])

En el segundo caso la paciente se encuentre frente a una anemia de tipo inmunitario, inducida por la ingesta de medicamentos, el cual activa al

complemento produciendo una hemólisis extravasculares, debido a la deformación del eritrocito, produciendo debilidad para luego fragmentarse, por esta razón las pruebas realizadas dan positivo.
En el tercer caso el paciente no sufre de hemoglobinuria paroxistica nocturna confirmada con la clínica, más bien sería una anemia aplasica debido a una falla medular.

Por otro lado es interesante el cuarto caso si bien es un caso positivo de autohemolisis confirmado desencadenado por el lupus que padece donde predomina la IgG (aglutinina caliente) y a veces se asocia a la IgM (aglutinina fría); los eritrocitos son secuestrados en el bazo y ahí se produce la hemólisis por fa destrucción de los mismos, los resultados de las pruebas de Ham, Sucrosa y autohemolisis nos dan negativos siendo que estos, Según bibliografía la explicación es puede dar en casos de politransfución, como sucedió con esta paciente que recibió una unidad antes de su análisis laboratorial, siendo esta la explicación de los resultados obtenidos.
La incidencia de anemia hemolítica es de 4 de cada 100.000 personas de ahí la importancia para la optimización de pruebas nuevas obteniendo rangos de referencia en nuestro país, pues si bien existen pruebas que se realizan para el diagnostico de anemia hemolítica, como son la prueba de Coombs, fragilidad osmótica estas no son suficientes, puesto que la anemia hemolítica es variada en su etiología y de diferentes tipos de patologías.
Por esta razón se hace necesario la implementación de las técnicas de autohemolisis, Test de Ham —Dacie y Test Sucrosa en nuestro medio puesto que las razas, etnias en el mundo están fusionadas totalmente, como se ha visto estos casos de tipo asiático también existen en Bolivia,
Estas pruebas ponen en manifiesto el porcentaje de hemólisis presente en los hematíes, constituyen procedimientos importantes para coadyuvar y ampliar en el diagnostico de las diferentes patologías que se presentan en los eritrocitos([2]), dando una pauta al galeno para su adecuado tratamiento.

X. CONCLUSIONES

En el presente trabajo fue posible estandarizar los test de Ham, sucrosa y Autohemolisis, en una población comprendida entre 15 a 55 años, estableciéndose un rango de referencia para cada prueba.
Los rangos obtenidos son: Para el Test de Autohemolisis sin adición de glucosa es de 0.46 a 1 y adicionando glucosa es de 0.07 a 0.87 %
Para el test de Ham — Dacie el rango se encuentra entre 0.87 a 1.64%.
Para el test de Sucrosa es de 1 .01 a 1.90 %.

Analizando los casos se comprueba que las técnicas optimizadas son aplicables en Bolivia dando resultados confiables para el médico, y además coadyuvan en el diagnostico de anemia hemolítica.
La prueba de Ham — Dacie muchas veces da resultados falso negativos en la HPN, por lo que se debe complementar el examen con la prueba de sucrosa que es mas sensible pero menos especifica.(2)
Muchas veces la adición de glucosa corrige la hemólisis producida pues el ATP es una fuente importante en la membrana eritrocitaria para el intercambio de energía. por lo tanto también se debe realizar las dos pruebas para saber si es por deficiencia de ATP o por otra causa, para determinación de anemia hemolítica esferocitaria. 0[8])

XI. BIBLIOGRAFIA

1. JANDL, James H. Blood, Text Book of Hematology, Editorial Little, Brow and Company Boston / Toronto. 1987.
2. TURGEON, Mary Louse: Clinical Hematology, Theory and procedures, Editorial Little, Brown and Company Boston / Toronto. 1987,
3. VIVES Jean Lluis, AGUILAR, Josep Lluis . Manual de Técnicas de Laboratorio en Hematologia, Editorial Salvat Editores S.A. Barcelona Espaha. 1987.
4. RIEDLER, Georg F. ZINGG Raoul : Tabulae Hematologicae, Editorial Editiones Roche , Basilea, Suiza. 1977.
5. McKENZlE, Shirlyn B. Hematologia Clinica , Editorial el manual moderno, S.A. de C:V mexico D.F 1985.
6. VELEZ, Hernan. Hematologia. Editorial Ecuador 1992.
7. O.P.S. La Salud en Las Americas, Vol Il Editorial Quality S.R.L.1999.
8. Provan D, O' Shaughnessy D F. Recent advances in haematology. BMJ
   1999.
9. BROWNER w s, Newman TB, Cummins SR. Disefio de un Nuevo estudio: Ill. Pruebas Diagnosticas. En Hulley SB, Cummins SR,editores. Disafio de la investigación clínica 1ra edición Doyma Barcelona;1993.
10. Blood Disorders - G6PD (Glucose-6-Phosphate) - Spanish Content Methodist Health Care System, Houston, Texas.htm
11. HARRISON,Machar Hill. principios de Medicina Interna, Vol 1 Ed, Madrid -Espafia. 1998.
12. RUIZ, Arguellas G.J. Fundamentos de Hematologia. Editores Médica Panamericana México. 1998.
13. GOMEZ.L.Patricia. Manual de hematologia instituto SELADIS. 2000
14. SMITH, Lloyd H Fisiopatología .Editorial medica Panamericana Buenos Aires.Argentina 1991.

15. PARDO, J. G Anatomía patológica Editorial Mosby 1996.
16. Jesus San Miguel Harcot-Brace Principios de Hematología. Salamanca España 1997.
17. OSORIO.G.S Hematología diagnostica y terapéutica. Editorial Mediterráneo Ltda. 1996.
18. SANS SABRAFÉN J. HEMATOLOGÍA Clínica. Barcelona, Mosby Doyma Libros, 1994.
19. WILLIAMS WJ, BEUTLER E, ERSLEV AJ, LICHTMAN MA. HEMATOLOGY: BASIC PRINCIPLES AND PRACTICE. New York:
Churchill Livingstone, 1991
20. FARRERAS ROZMÁN. MEDICINA INTERNA, 13 edición, Mosby/Doyma Libros, Barcelona 1995.
21. DÍAZ-RUBIO M, ESPINÓS D. TRATADO DE MEDICINA INTERNA. le edición. Editorial Panamericana, Madrid 1994.
22. MEDICINE. Programa de Formación Continuada en Medicina Asistencial. P edición. IDEPSA, Madrid 1996.
23. RODÉS / GUARDIA. MEDICINA INTERNA, 1' Edición. Editorial Masson
1997
24. HARRISON. PRINCIPIOS DE MEDICINA INTERNA. 14E edición. McGraw Híll ed, 1998.
25. CECIL. TRATADO DE MEDICINA INTERNA. 20e Edición. McGraw-Hill Interamericana
1997.
26.- CASAS, SALVEAMICH.LABORATORIO EN HEMATOLOGIA Edición 1994 Interamericana.Mc Graw.

ANEXOS

ANEXO I.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Solución Glucosa al 10%

IO mg de dextrosa
100 ml de agua destilada
Disolver y esterilizar en autoclave

Reactivo de Drabkin

- 50 mg de cianuro de potasio
200 mg de ferrocianuro de potasio
Disolver en un litro de agua destilada Esterilizar

Solución de Sacarosa
9,24 g de sacarosa
Disolver en 100 ml de agua desionizada

Ácido clorhídrico 0,2 N

Colocar 20 ml de ácido clorhídrico 1 N
Diluir en 100 ml de agua destilada

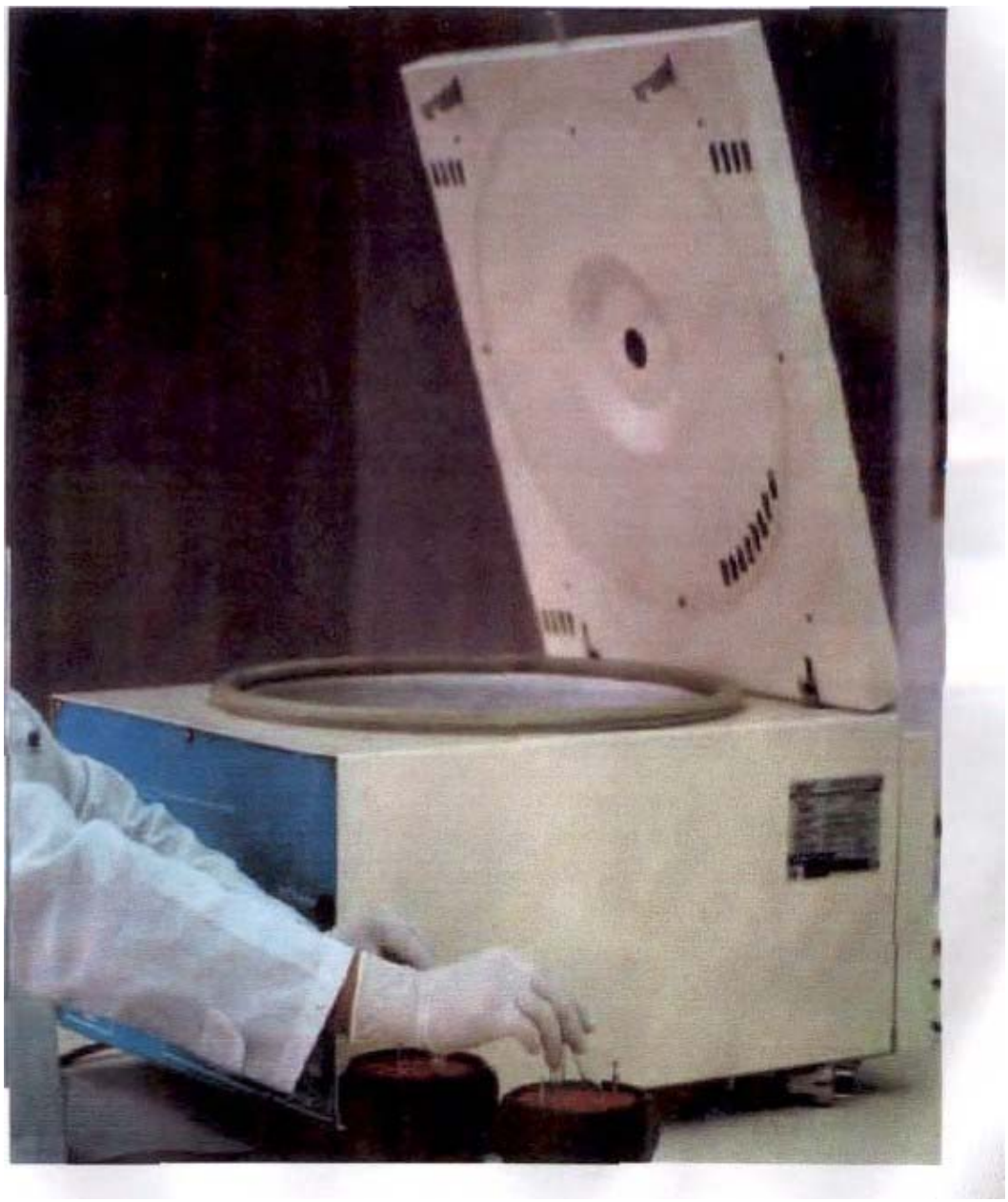
Solución de cloruro de sodio al 0,85%

8,5 grs de cloruro de sodio disolver en un litro de agua destilada esterilizada

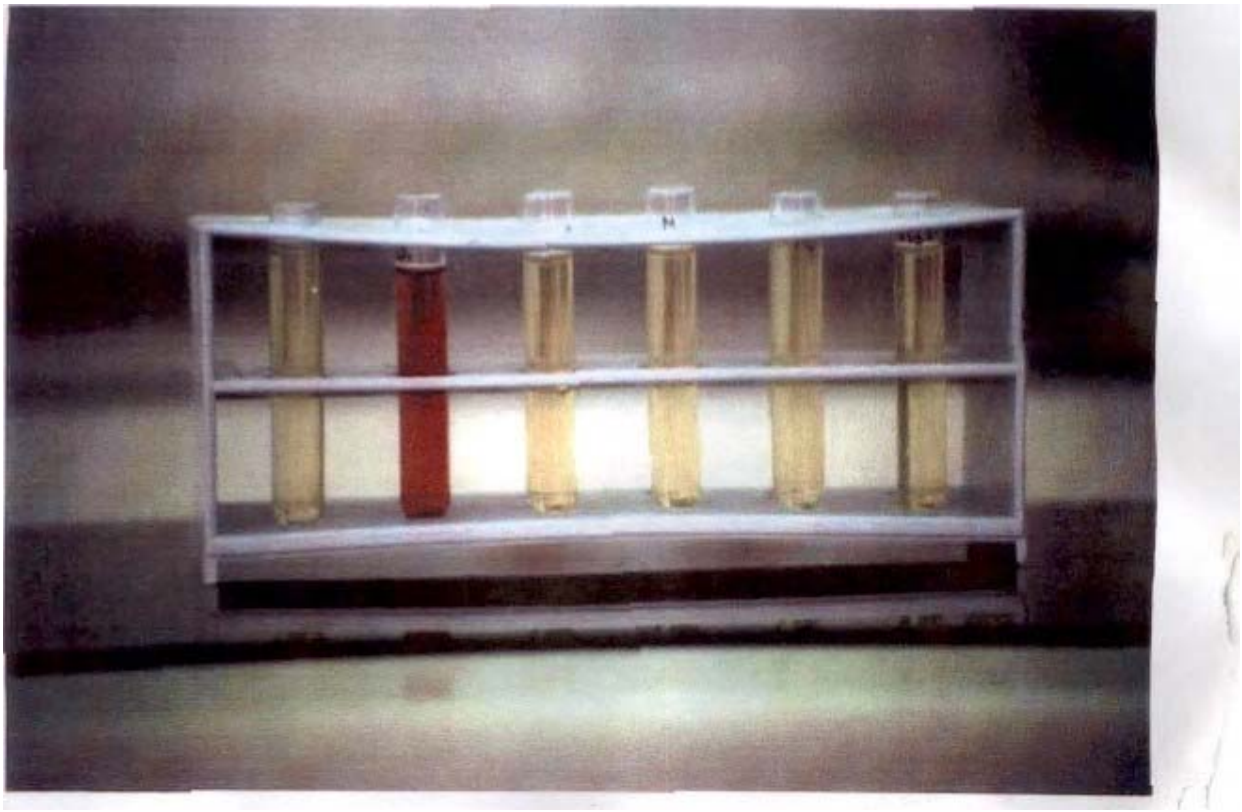
ANEXO ll

FOTOGRAFIAS TOMADAS AL REALIZAR EL TRABAJO

FOT. 1 INCUBACION DEL TEST DE AUTOHEMOLISIS

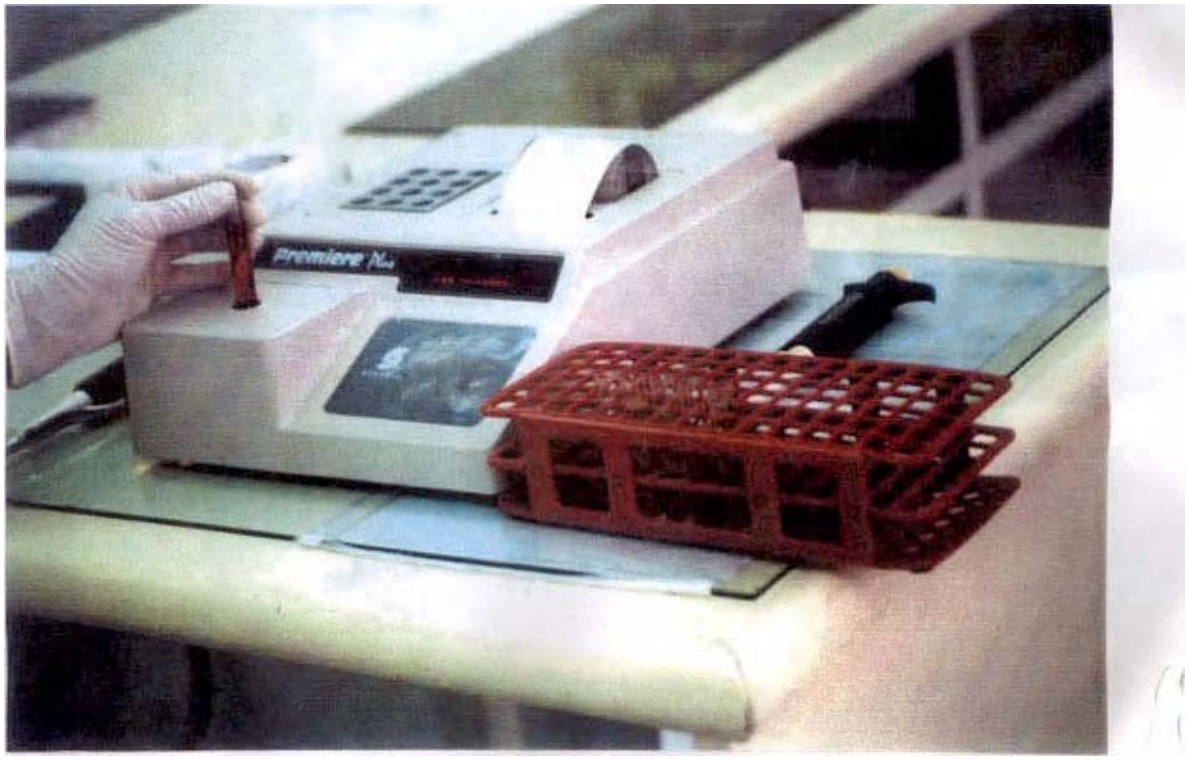


FOT_ 2.- CENTRIFUGACIONOEL TEST DE HAM

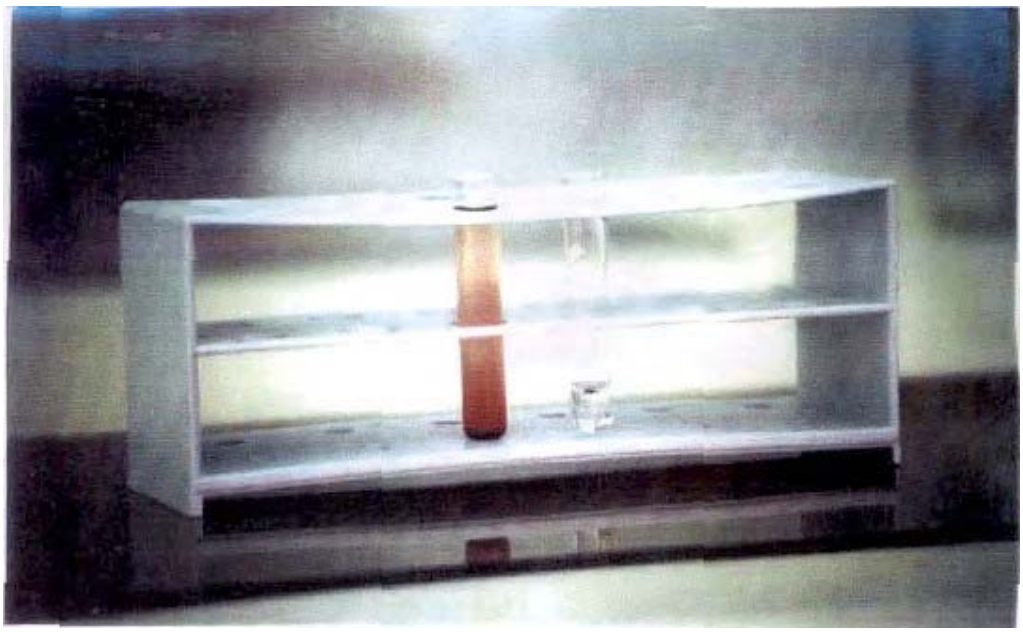


FOT. 3.- TUBOS DEL TEST DE SUCROSA CON REACTIVO DE DRABKIN

FOT. 4.- TUBOS CON REACTIVO DE DRABKIN DEL TEST DE HAM



FOT. 5.- LECTURA DEL TEST DE AUTOHEMOLISIS



FOT 6.- LAVADO DE GLOBULOS ROJOS

ANEXO III

Costos:

Las pruebas optimizadas tienen un costo de:

Prueba de Ham — Dacie 1.25 $us
Prueba de Sucrosa 0.93 $us Test de
Autohemólisis 1.80 $us