

HEMATOLOGÍA ANALÍTICA

Tomol

Sexta edición

HEMATOLOGÍA ANALÍTICA

Una vez más, esta nueva edición pretende ser una herramienta de consulta de muy alto impacto para los estudiantes de ciencias médicas, que desean incursionar en el campo de la Hematología, para suministrar la base científica y sus aplicaciones clínicas.

Para lograr una obra de excelente calidad científica se ha seleccionado a los profesionales más destacados en el campo de la Hematología, quienes, por su prestigio y experiencia, han aportado su invaluable conocimiento al servicio y beneficio de la comunidad académico-profesional de esta especialidad.

TOMO I
TEORÍA

6
EDICIÓN

EDITOR CIENTÍFICO
GERMAN SÁENZ RENAULD

COORDINADORES EDITORIALES
BERTA E. VALVERDE ROJAS
WALTER RODRÍGUEZ ROMERO



HEMATOLOGÍA ANALÍTICA

Tomo II

Sexta edición

HEMATOLOGÍA ANALÍTICA

Una vez más, esta nueva edición pretende ser una herramienta de consulta de muy alto impacto para los estudiantes de ciencias médicas, que desean incursionar en el campo de la Hematología, para suministrar la base científica y sus aplicaciones clínicas.

Para lograr una obra de excelente calidad científica se ha seleccionado a los profesionales más destacados en el campo de la Hematología, quienes, por su prestigio y experiencia, han aportado su invaluable conocimiento al servicio y beneficio de la comunidad académico-profesional de esta especialidad.

TOMO II
LABORATORIO

6
EDICIÓN

EDITOR CIENTÍFICO
GERMAN SÁENZ RENAULD

COORDINADORES EDITORIALES
BERTA E. VALVERDE ROJAS
WALTER RODRÍGUEZ ROMERO



HEMATOLOGÍA ANALÍTICA

TOMO I
TEORÍA

6
EDICIÓN

EDITOR CIENTÍFICO
GERMAN SÁENZ RENAULD

COORDINADORES EDITORIALES
BERTA E. VALVERDE ROJAS
WALTER RODRÍGUEZ ROMERO



WH100
H487he6 Hematología Analítica / Editor German F. Sáenz
Renauld. -- 6° ed. -- San José, C. R.:
EDNASSS-CCSS, 2016.
2 v. : 706 p. ; il. ; 21.6 x 27.9 cm.
ISBN: 978-9968-916-58-5

1. HEMATOLOGÍA. 2. SANGRE. 3. ENFERMEDADES
HEMATOLÓGICAS. I. Sáenz Renauld, German F., Editor

La publicación de la sexta edición de esta obra fue aprobada por el Consejo Editorial de EDNASSS, en la sesión N° 147, del 19 de noviembre de 2014.

Levantado de texto: los autores.

Diseño portada: Alexander Alvarado Madrigal

Artes e impresión: M&RG Diseño y Producción Gráfica, S.A.

Primera edición: 1981- Universidad de Costa Rica.

Segunda edición: 1987- Universidad de Costa Rica.

Tercera edición: 1995- Editorial Nacional de Salud y Seguridad Social (EDNASSS).

Cuarta edición: 2003- Editorial Nacional de Salud y Seguridad Social (EDNASSS).

Quinta edición: 2008- Editorial Nacional de Salud y Seguridad Social (EDNASSS).

Sexta edición: 2016 - Editorial Nacional de Salud y Seguridad Social (EDNASSS).

© Editorial Nacional de Salud y Seguridad Social (EDNASSS) 2016.

Centro de Desarrollo Estratégico e Información en Salud y Seguridad Social.

Caja Costarricense de Seguro Social (CCSS).

Teléfono: 2221-6193. Fax: 2233-8359

Correo electrónico: ednasss@ns.binasss.sa.cr

EDNASSS: una editorial al servicio de la salud y la seguridad social

EDITORES Y AUTORES INVITADOS

Dr. German F. Sáenz Renauld
Editor científico

Microbiólogo Químico Clínico (MQC), especialista en Hematología, Msci. Catedrático jubilado, Cátedra de Hematología. Exdirector del Departamento de Análisis Clínicos, exdirector de la Cátedra de Hematología, Departamento de Análisis Clínicos, Facultad de Microbiología, exdirector y asesor científico del Centro de Investigación en Hemoglobinas Anormales y Trastornos Afines (CIHATA), Vicerrectoría de Investigación, Universidad de Costa Rica (UCR).

Dra. Berta Valverde Rojas
Coordinadora editorial

MQC, especialista en Hematología, UCR. Profesora invitada, Cátedra de Hematología, Departamento de Análisis Clínicos, Facultad de Microbiología. Profesora del Sistema de Estudios de Postgrado, Universidad de Costa Rica. Subjefa del Laboratorio de Investigación, Hospital Nacional de Niños, Caja Costarricense de Seguro Social (CCSS).

Dr. Walter E. Rodríguez Romero
Coordinador editorial

MQC, especialista en Hematología. Profesor asociado, Cátedra de Hematología, Departamento de Análisis Clínicos, Director del Departamento de Análisis Clínicos, Facultad de Microbiología. Exdirector del CIHATA, Vicerrectoría de Investigación. Profesor del Sistema de Estudios de Postgrado, UCR.

Dr. Rafael Jiménez Bonilla
Coeditor

MQC, MSc, catedrático, Cátedra de Hematología, Departamento de Análisis Clínicos, Facultad de Microbiología. Exprofesor del Sistema de Estudios de Postgrado, UCR. Exdirector del Laboratorio de Investigación y de la Unidad de Bioética e Investigación, Hospital Nacional de Niños, CCSS.

Dra. Lidiette Salazar Palma
Coeditora

MQC, especialista en Hematología, Universidad de Costa Rica. Profesora invitada de la Cátedra de Hematología UCR; profesora de la Facultad de Medicina, UCR. Jefa del Laboratorio del Servicio de Hematología, Hospital Calderón Guardia, CCSS.

Dra. Sandra Boza Oreamuno

MQC, UCR. Profesora instructora, Cátedra de Hematología, Facultad de Microbiología, UCR.

Dr. Walter Cartín Sánchez

MQC, especialista en Hematología, UCR. Director del Laboratorio de Estudios Especializados e Investigación, Hospital Nacional de Niños, CCSS.

Dr. Jorge Elizondo Almeida

Médico infectólogo, UCR. Máster en Salud Pública, Universidad de Miami. Profesor del Sistema de Estudios de Postgrado, Escuela de Medicina, UCR. Médico asistente, especialista. Cátedra y Servicio Dermatología-Alergología, Hospital México, CCSS.

Dr. Jorge Fonseca González

MQC, inmunólogo. Profesor del Sistema de Estudios de Postgrado, UCR. Jefe del Laboratorio de Inmunología, Hospital México, CCSS.

Dra. Melissa Granados Zamora

MQC, especialista en Hematología, UCR. Profesora instructora, Cátedra de Hematología, Facultad de Microbiología, UCR.

Dr. Evan Jensen Gamboa	MQC, especialista en Hematología, UCR. Suficiencia investigadora, Universidad de Salamanca. Profesor del Sistema de Estudios Postgrado, UCR. Citometrista certificado por la <i>International Cytometry Certification Examination</i> (ICCE).
Dra. María Paz León Bratti	Médico especialista en Medicina Interna e Inmunología Clínica, Hospital México, CCSS. Profesora de la Cátedra de Medicina de la Facultad de Medicina, UCR.
Dr. Jorge López Villegas	MQC, especialista en Hematología, UCR. Laboratorio del Servicio de Hematología. Hospital Rafael Ángel Calderón Guardia, CCSS.
Dra. Victoria Monterroso Azofeifa (†)	Médico especialista en Patología, Servicio de Patología, Hospital México, CCSS. Exprofesora de la Facultad de Medicina y del Sistema de Estudios de Postgrado de la UCR.
Dr. Luis Mora Bermúdez	MQC, especialista en Hematología, UCR. Profesor de la Cátedra de Bioquímica Hematológica, Universidad de Ciencias Médicas (UCIMED).
Dra. Marta Navarrete Durán	Médico pediatra, Universidad Autónoma de Guadalajara; especialista en Hematología, UCR. Profesora del Sistema de Estudios Postgrado, UCR. Jefe clínica, Servicio de Hematología, Hospital Nacional de Niños, CCSS.
Dra. Catalina Obando Jiménez	MQC, UCR. Máster en Salud Pública, Universidad Santa Lucía, especialista en Citogenética. Sección de Citogenética, Laboratorio Clínico, Hospital Nacional de Niños, CCSS.
Dra. Priscila Orlich Pérez	MQC, especialista en Inmunología Clínica, UCR. Especialista en Inmunohematología, UCR. Directora, División del Banco de Sangre de Cordón Umbilical y Células Madre, Hospital San Juan de Dios, CCSS.
Dr. Juan Richmond Navarro	Médico hematólogo, UCR y Universidad Salamanca, España. Director, Servicio de Hematología del Hospital Rafael Ángel Calderón Guardia, CCSS.
Dr. Miguel Rodríguez Pineda	Médico especialista en Hematología, UCR y MQC especialista en Medicina Transfuncional, UCR. Profesor de Inmunohematología, Facultad de Microbiología UCR y médico hematólogo del Hospital Rafael Ángel Calderón Guardia, CCSS.
Dra. María Rodríguez Sevilla	Médico especialista en Hematología, UCR. Profesora del Sistema de Estudios Postgrado, UCR. Servicio de Hematología del Hospital San Juan de Dios, CCSS.
Dra. Xinia Rojas Camacho	MQC, especialista en Inmunohematología, UCR. Directora del Banco de Sangre, Hospital México, CCSS.
Dr. Luis F. Rojas Solano	Bioquímico, MSc. Catedrático jubilado de la UCR, Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina UCR. Profesor de Bioquímica de la Universidad Autónoma de Centro América (UACA).

Dr. Carlos Santamaría Quesada	MQC, PhD Ciencias Médicas, Universidad de Salamanca, España. Máster en Microbiología, Parasitología y Química Clínica, UCR. Jefe de División de Diagnóstico Molecular, Laboratorio Clínico, Hospital Nacional de Niños, CCSS.
Dra. Kathia Valverde Muñoz	Médico pediatra, especialista en Hematología, UCR. Servicio de Infectología, Hospital Nacional de Niños, CCSS.
Dr. Luis F. Vásquez Castillo	Médico hematólogo. Director del Servicio de Hematología, Hospital San Juan de Dios, CCSS.
Dra. Patricia Venegas Barboza	MQC, UCR. Especialista en Citogenética. Sección de Citogenética, Laboratorio Clínico, Hospital Nacional de Niños, CCSS.
Dr. Rolando Ulloa Gutiérrez	Médico pediatra infectólogo, UCR y Universidad de British Columbia, Vancouver. Servicio de Infectología Pediátrica, Hospital Nacional de Niños. Profesor del Departamento de Pediatría de la Escuela de Medicina de la UCR, profesor de Postgrado en Pediatría, UCR y Hospital Nacional de Niños, Universidad Iberoamericana.

PRÓLOGO DE LA SEXTA EDICIÓN

En los últimos 25 años se han logrado importantes progresos en cuanto al pronóstico y diagnóstico de diversos padecimientos hematológicos, especialmente relacionados con la citogenética, la inmunología y la biología molecular, aplicables en gran medida al estudio de la patobiología de las neoplasias.

Esos avances han sido incorporados en esta sexta edición, así como los destacados adelantos en el estudio de la hemoglobina y sus derivados, los síndromes anémicos y hemolíticos, los leucocitos, la tipología y la función de los linfocitos, el trasplante de médula ósea, la medicina transfusional, la trombosis y la hemostasia. Además, en esta nueva edición se le ha dado mayor énfasis a la citogenética aplicada.

Deseo destacar la organización estructural del contenido de esta obra, que permitirá un manejo más versátil y coherente. Al igual que en la edición anterior, el Tomo I se refiere a la teoría y el Tomo II a aspectos técnicos y metodológicos; en este último es donde se ha incluido el laboratorio de coagulación sanguínea, que facilitará la determinación de los factores de trombofilia con pruebas de última generación y que suministrará una mayor comprensión de los agentes antitrombóticos, los problemas de sangrado y la administración y el control de la anticoagulación, de los fibrinolíticos y de los antiagregantes plaquetarios. No ha escapado al interés de esta nueva edición referirnos a la "hematología nacional" y sus implicaciones epidemiológicas, especialmente en las áreas relacionadas con las hemoglobinopatías y las neoplasias.

Esta sexta edición se ha publicado gracias al apoyo de la Caja Costarricense de Seguro Social, a través de la EDNASSS, lo cual nos compromete sobremanera. La incorporación de nuevos y distinguidos coeditores, así como de nuevos autores colaboradores con capítulos específicos, le han dado a esta edición -última bajo mi responsabilidad- un carácter de obra multidisciplinaria y actualizada, que esperamos sea bien recibida por los estudiantes universitarios y los colegas de ciencias médicas que nos honren con su lectura.

Mención especial a la contribución de la Dra. Berta Valverde, quien coordinó el trabajo de todos los estimados y relevantes editores del texto, con el deseo -fructífero- de lograr un trabajo intelectual altamente apreciado.

Gracias a todos,

Dr. German Sáenz Renauld
San José, Costa Rica



Louis Pasteur

“Quiero compartir con ustedes el secreto que me ha llevado a alcanzar todas mis metas: mi fuerza reside únicamente en mi tenacidad”

LOUIS PASTEUR
CREADOR DE LA MICROBIOLOGÍA
1854

PRESENTACIÓN

Reitero lo expresado en mi proemio de la quinta edición del libro Hematología Analítica, teoría, técnica, interpretación, y me permito agregar en esta sexta publicación, que lo aquí entregado al estudio de la Hematología es un esfuerzo digno de encomio; alabanza que junto al editor responsable, Dr. German Sáenz Renauld, debe recibirla el conjunto de autores participantes, mucho de ellos jóvenes promesas que pondrán siempre en alto la hematología nacional.

En la antigua religión irania se conocen seis periodos de la creación, que corresponden a seis ángeles superiores: “los amesha spentas”, que rodean al dios Ahura Mazda. En la interpretación cristiana el símbolo de seis puntas formado por dos triángulos, puede ser el mundo que se dividía en cielo y tierra.

Una sexta edición científica señala, a mi juicio: perseverancia, dedicación, interés, esfuerzo, capacidad y conocimiento.

Felicito sinceramente al editor y al conjunto de autores.

Dr. Jorge Elizondo Cerdas
Catedrático, Universidad de Costa Rica
Ex-Director del Servicio de Hematología
Hospital San Juan de Dios

DEDICATORIA

*Al Dr. Ettore De Girolami (†), mi maestro, de quien
obtuve la mejor de las enseñanzas: respeto por las
ciencias y amor por la Hematología.*

A mis padres y a Arturo (QdDg).

A Cecilia por su comprensión y apoyo.

German F. Sáenz Renaud

AD MOIRA

*Para nuestros hijos
Y otros estudiantes del presente,
Nuestra esperanza para el futuro.*

AGRADECIMIENTO

A la Sra. Rocío Guerrero Brown y al Sr. Walter González Luna.

Los editores y autores deseamos manifestar nuestro más profundo agradecimiento por su inestimable colaboración en el desarrollo de los documentos que han permitido esta sexta edición.

Por ello, nuestra imperecedera gratitud.

ÍNDICE TOMO I

Capítulo 1.	Hematopoyesis y células madre.....	1
	<i>Dr. Juan Richmond Navarro</i>	
	<i>Dr. German F. Sáenz Renauld</i>	
	<i>Dr. Walter Rodríguez Romero</i>	
Capítulo 2.	Estructura de la hemoglobina y su papel biológico.....	11
	<i>Dr. Luis F. Rojas Solano</i>	
	<i>Dr. Luis A. Mora Bermúdez</i>	
Capítulo 3.	Síndrome anémico.....	33
	<i>Dr. German F. Sáenz Renauld</i>	
	<i>Dra. María Rodríguez Sevilla</i>	
Capítulo 4.	Metabolismo del hierro y anemia por deficiencia de hierro.....	45
	<i>Dr. Luis Mora Bermúdez</i>	
	<i>Dra. Berta E. Valverde Rojas</i>	
Capítulo 5.	Anemia megaloblástica.....	57
	<i>Dra. Berta E. Valverde Rojas</i>	
	<i>Dra. María Rodríguez Sevilla</i>	
Capítulo 6.	Anemia aplásica, aplasia pura de serie roja, hemoglobinuria paroxística nocturna y otras pancitopenias.....	65
	<i>Dr. German F. Sáenz Renauld</i>	
	<i>Dra. Marta Navarrete Durán</i>	
	<i>Dra. Gabriela Granados Brenes</i>	
Capítulo 7.	Anemia y otros trastornos hematológicos en los desórdenes crónicos.....	79
	<i>Dr. Miguel Rodríguez Pineda</i>	
	<i>Dra. Lidiette Salazar Palma</i>	
Capítulo 8.	El síndrome hemolítico.....	87
	<i>Dr. German F. Sáenz Renauld</i>	
Capítulo 9.	Hemólisis por membranopatías y enzimopatías.....	103
	<i>Dr. Walter E. Rodríguez Romero</i>	
	<i>Dr. German F. Sáenz Renauld</i>	
	<i>Dra. Sandra Boza Oreamuno</i>	
Capítulo 10.	Anemia hemolítica inmunológica.....	123
	<i>Dr. Miguel Rodríguez Pineda</i>	
	<i>Dr. Juan Richmond Navarro</i>	
Capítulo 11.	Hemoglobinas anormales.....	133
	<i>Dr. German F. Sáenz Renauld</i>	
	<i>Dr. Walter E. Rodríguez Romero</i>	
Capítulo 12.	Síndromes drepanocíticos y otras hemoglobinopatías.....	145
	<i>Dr. German F. Sáenz Renauld</i>	
	<i>Dr. Walter E. Rodríguez Romero</i>	
	<i>Dr. Miguel A. Rodríguez Pineda</i>	
Capítulo 13.	Síndromes de beta y alfa talasemia.....	157
	<i>Dr. Walter E. Rodríguez Romero</i>	
	<i>Dr. German F. Sáenz Renauld</i>	

Capítulo 14.	Leucocitos: producción, cinética y función. Sistema mononuclear fagocítico...	175
	<i>Dr. Rafael Jiménez Bonilla</i> <i>Dra. Lidiette Salazar Palma</i> <i>Dra. Berta E. Valverde Rojas</i> <i>Dr. Walter Cartín Sánchez</i>	
Capítulo 15.	Tipología y función de linfocitos.....	193
	<i>Dra. Berta E. Valverde Rojas</i>	
Capítulo 16.	Hallazgos hematológicos en procesos infecciosos.....	199
	<i>Dr. Rolando Ulloa Gutiérrez</i> <i>Dr. Jorge Elizondo Almeida</i> <i>Dr. German F. Sáenz Renauld</i>	
Capítulo 17.	Cambios hematológicos etarios y en el embarazo.....	215
	<i>Dra. Lidiette Salazar Palma</i> <i>Dra. Kathia Valverde Muñoz</i>	
Capítulo 18.	Estudio integral de las adenopatías.....	227
	<i>Dr. Juan Richmond Navarro</i> <i>Dr. German F. Sáenz Renauld</i>	
Capítulo 19.	Enfermedad de Hodgkin.....	243
	<i>Dra. Victoria Monterroso Azofeifa (†)</i> <i>Dr. Fernando Brenes Pino</i> <i>Dr. Malcom Acón Laws</i>	
Capítulo 20.	Linfoma no Hodgkin.....	259
	<i>Dra. Victoria Monterroso Azofeifa (†)</i> <i>Dr. Fernando Brenes Pino</i> <i>Dr. Malcom Acón Laws</i>	
Capítulo 21.	Síndromes linfoproliferativos crónicos con expresión leucémica.....	285
	<i>Dr. Juan Richmond Navarro</i> <i>Dr. German F. Sáenz Renauld</i>	
Capítulo 22.	Síndromes mieloproliferativos crónicos.....	299
	<i>Dr. Luis F. Vásquez Castillo</i> <i>Dr. Miguel Rodríguez Pineda</i> <i>Dra. Melissa Granados Zamora</i>	
Capítulo 23.	Síndromes mielodisplásicos.....	307
	<i>Dr. Willem Buján Boza</i> <i>Dra. María Rodríguez Sevilla</i> <i>Dr. German F. Sáenz Renauld</i>	
Capítulo 24.	Leucemia aguda.....	317
	<i>Dra. Berta Valverde Rojas</i> <i>Dra. Marta Navarrete Durán</i> <i>Dr. Luis F. Vásquez Castillo</i>	
Capítulo 25.	Mieloma múltiple y otras gammapatías monoclonales.....	331
	<i>Dr. Jorge Fonseca González</i> <i>Dr. Juan Richmond Navarro</i>	
Capítulo 26.	Estudio de la médula ósea: el mielograma.....	347
	<i>Dra. Lidiette Salazar Palma</i> <i>Dr. German F. Sáenz Renauld</i>	

Capítulo 27.	Trasplante de células madre hematopoyéticas.....	365
	<i>Dra. María Rodríguez Sevilla</i>	
	<i>Dr. Luis F. Vásquez Castillo</i>	
	<i>Dr. Willem Buján Boza</i>	
	<i>Dra. Priscilla Orlich Pérez</i>	
Capítulo 28.	Medicina transfusional.....	373
	<i>Dra. Xinia Rojas Camacho</i>	
	<i>Dr. Miguel Rodríguez Pineda</i>	
	<i>Dra. Ana Lorena Caballero Serrano</i>	
Capítulo 29.	Citometría de flujo en la hematología.....	385
	<i>Dr. Evan B. Jensen Gamboa</i>	
	<i>Dra. Berta E. Valverde Rojas</i>	
Capítulo 30.	Conceptos básicos de citogenética y sus aplicaciones a la hematología.....	395
	<i>Dra. Catalina Obando Jiménez</i>	
Capítulo 31.	La biología molecular aplicada a la hematología.....	415
	<i>Dr. Carlos Santamaría Quesada</i>	
	<i>Dra. Melissa Granados Zamora</i>	
Capítulo 32.	Hemostasia normal.....	429
	<i>Dr. Rafael Jiménez Bonilla</i>	
	<i>Dr. Jorge A. López Villegas</i>	
Capítulo 33.	Problemas de sangrado.....	437
	<i>Dr. Rafael Jiménez Bonilla</i>	
	<i>Dr. Jorge A. López Villegas</i>	
Capítulo 34.	El síndrome antifosfolípido.....	449
	<i>Dra. María Paz León Bratti</i>	
	<i>Dr. Jorge Fonseca González</i>	
Capítulo 35.	Problemas trombóticos.....	457
	<i>Dr. Rafael Jiménez Bonilla</i>	
	<i>Dr. Guillermo Jiménez Cruz</i>	
Capítulo 36.	Administración y control de la anticoagulación, de los fibrinolíticos y de los antiagregantes plaquetarios.....	465
	<i>Dr. Rafael Jiménez Bonilla</i>	
	<i>Dr. Guillermo Jiménez Cruz</i>	

HEMATOPOYESIS Y CÉLULAS MADRE

Dr. Juan E. Richmond Navarro
Dr. German F. Sáenz Renauld
Dr. Walter Rodríguez Romero

HEMATOPOYESIS

Introducción

La hematopoyesis o hemopoyesis es el mecanismo responsable de la producción, crecimiento y diferenciación de las células hematológicas; ocurre en la trama de células estromales de la médula ósea, donde se encuentran las células hematológicas (eritrocitos, leucocitos, plaquetas) en diferentes estadios de maduración. Además, permite la reposición constante de las células y la respuesta acelerada a demandas fisiológicas ante situaciones de estrés (infecciones, deficiencias nutricionales, neoplasia).

En la etapa embrionaria, la hematopoyesis se desarrolla en el saco vitelino, mientras que en la etapa fetal se da en el hígado y en el bazo, e irá declinando antes del nacimiento, para posicionar a la médula ósea como centro hematopoyético en el recién nacido. El hígado y el bazo mantendrán su capacidad hematopoyética, la cual se reactivará ante eventuales demandas en donde la médula ósea sea incapaz de responder adecuadamente.

En el recién nacido y en los primeros dos años de vida, la médula ósea está activa en todas las cavidades óseas (médula roja), pero con el desarrollo, se da reemplazo por grasa (médula amarilla) y su actividad disminuye hasta concretarse en huesos planos como pelvis, esternón, costillas y vértebras. En la vejez se aprecian estos sitios reemplazados por médula grasa.

Fases de la hematopoyesis

En general, se puede decir que la hematopoyesis pasa por tres fases o periodos:

1. *Embionario* (extracorporal, extramedular, intravascular o mesenquimatoso): con síntesis de hemoglobinas embrionarias de poca duración (1-2 meses) y de función desconocida.
2. *Hepático-esplénico*: del cuarto al noveno mes, con síntesis fundamentalmente de hemoglobina fetal (HbF).

3. *Mieloide o medular-ganglionar*, con síntesis preferencial de hemoglobina A (HbA) y producción en médula ósea de prácticamente todos los elementos de la sangre (eritrocitos, leucocitos, plaquetas).

En el período embrionario una parte del mesénquima se diferencia en células mesenquimatosas germinativas o tronco para la hemopoyesis. Estas aparecen en el saco vitelino del embrión de dos semanas (5 mm) y se organizan en los llamados islotes sanguíneos de Wolff, dando origen al endotelio primitivo y a las primeras células sanguíneas de la serie eritrocítica: los grandes eritroblastos primitivos; así como a las primeras células sanguíneas que ya contienen hemoglobina (hemoglobinas embrionarias tipo Gower 1 ($\zeta_2\epsilon_2$), Gower II ($\alpha_2\epsilon_2$) y Portland (ζ_2g_2)). Esos grandes eritroblastos no logran madurar hasta eritrocitos. Algunas de las células germinales o células madre de la hemopoyesis migran de los sitios extraembrionarios (saco vitelino) al hígado y al bazo, para hacer hemopoyesis en ellos.

A las seis semanas de gestación, el hígado empieza a convertirse en el principal órgano hemopoyético, con producción fundamentalmente de eritroblastos y eritrocitos, y en menor proporción, de leucocitos y plaquetas. Al tercer mes se observa la presencia de la hemoglobina fetal ($\alpha_2\gamma_2$), que se convierte en el principal pigmento respiratorio del feto.

La función hematopoyética del hígado (máxima entre las semanas 12 y 16), permanece activa hasta unas pocas semanas antes del nacimiento. En cuanto al bazo, se debe mencionar que este es un órgano con menor función hemopoyética, al igual que el timo, en términos de linfopoyesis.

A partir de la onceava semana de la gestación se instaura la hematopoyesis medular, y ya a las 15 semanas se observa el inicio de la síntesis de la hemoglobina (Hb) A ($\alpha_2\beta_2$) y el cese de la Hb fetal (HbF) cinco semanas antes del nacimiento.

La actividad medular se aprecia en su máximo nivel en el último trimestre, asumiendo, por así decirlo, prácticamente toda la actividad hemopoyética en condiciones normales. Cabe destacar que al cuarto

mes de vida intrauterina, hay alrededor de 1×10^6 eritrocitos/ul y no se observan eritroblastos.

En situaciones de necesidad de incremento de la hematopoyesis, se produce una expansión de la médula roja hacia la médula grasa, e incluso en localizaciones extramedulares, como el bazo o el hígado, por la migración de las células madre a través de la sangre periférica.

Es importante señalar que los espacios medulares (en cualquier edad del adulto) no tienen una celularidad uniforme, por lo que no debe asumirse que una muestra solitaria o aislada representa el patrón celular mieloide. Sin embargo, en cresta ilíaca y en esternón se observa la mejor y real constitución de parénquima medular versus grasa. Esa relación tisular en el adulto es de 1:1 a 2:1.

CÉLULAS MADRE; CÉLULAS TRONCALES; CÉLULAS GERMINALES; STEM CELLS; CÉLULAS HEMOPOYÉTICAS PLURIPOTENCIALES

Las células madre son muy escasas y se hallan en la médula, específicamente en el lecho y el microambiente ("*nicho ecológico medular*") adecuados para su desarrollo, autorreplicación (cinética vital) y diferenciación hacia células maduras.

Por estímulos locales, las células madre se diferencian hacia células comprometidas, orientadas o monolineales, en un microambiente secundario, en donde luego actuarán sobre ellas los diversos factores de crecimiento o citoquinas, que promoverán una línea de maduración celular determinada.

La célula madre hematopoyética tiene capacidad de replicación, de autorrenovación (pool germinativo) y potencial de proliferación, junto a la capacidad para diferenciarse en los progenitores de todas las líneas celulares sanguíneas, que también poseen capacidad de autorreplicación; estas son la célula germinativa mieloide multilineal (UFC- GEMMG: granulocitos, eritroblastos, megacariocitos y macrófagos, por ejemplo) y la célula germinativa linfoide (UFC-L). A partir de estos elementos pluripotenciales y con capacidad de autorrenovación, se derivan otros ya comprometidos en un sentido de maduración único, que finalmente maduran a eritrocitos, granulocitos, mastocitos, monocitos y macrófagos, plaquetas, linfocitos T y B, células *natural Killer* y células dendríticas.

El antígeno CD34 es una glucoproteína expresada en la superficie de las células madre linfohematopoyéticas con capacidad de autorrenovación en los progenitores comprometidos hacia una determinada línea, en

algunas células endoteliales, en fibroblastos embrionarios y en las células del estroma medular. Se estima que el 1,5% de la población medular expresa el antígeno CD34.

Definición morfológica de la célula madre

Las células madre son células mononucleares pequeñas, agranulares, semejantes a pequeñas células de características linfoides, móviles, escasas, con una concentración en sangre de aproximadamente 2×10^5 células nucleadas (0,05%) (Cuadro N° 1).

Cuadro N° 1. Características de la célula madre pluripotente de la hematopoyesis

- γ Está presente en todas las fases ontogénicas.
- γ Se reconoce por su capacidad de formar colonias mixtas, microscópicamente visibles en bazo, así como *in vitro*.
- γ Las colonias son de naturaleza clonal.
- γ Son morfológicamente "linfocitos" e inmunológicamente "L. nulos".
- γ No presentan marcadores citoquímicos.
- γ Inmunofenotípicamente expresan: CD34, c-Kit, Thy-1, Flk-2/Flk-3 y AC133.
- γ Su autorreplicación y diferenciación depende del MIH: aquí mantienen una íntima interacción (célula-célula) con ese MIH: macrófagos, linfocitos, grasa y la microvasculatura (células adventiciales, etc.).

Organización funcional del tejido hematopoyético

El comportamiento germinativo se reconoce por su habilidad y extraordinaria virtud de automantenimiento y de diferenciarse en otras células más evolucionadas del orden hemopoyético, vale decir, células monolineales u orientadas, siempre germinales. Cinéticamente hablando, son células germinativas madre (α) la UFC-GEMMG y la UFC-L. Las otras células germinativas y las precursoras ya no poseen las características de autorrenovación.

En términos cinéticos, se les llama células alfa a aquellas células que pueden autoperpetuarse y, al mismo tiempo, dar lugar a células más diferenciadas (células n). El comportamiento de las células alfa (madres) puede ser simétrico $\alpha \rightarrow \alpha\lambda$, o asimétrico $\alpha \rightarrow \alpha n$ (Figura N° 1).

La cinética celular obliga a establecer el concepto de compartimiento, al que se define como aquel integrado por cualquier clase distintiva de células, independientemente de que la distinción se base en términos de función, morfología, estado de desarrollo u otras propiedades. Así, se habla de compartimiento

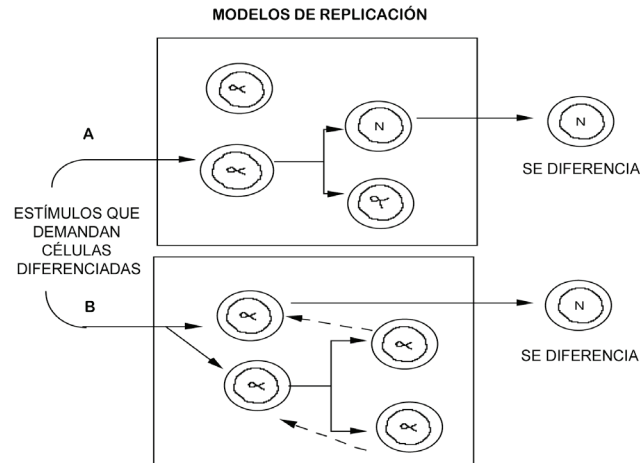


Figura N° 1. Compartimiento de células germinales.

pluripotencial o germinativo (células α) no restringido; compartimiento unipotencial comprometido (células n); compartimiento proliferativo, progenitor o precursor (blastos, por ejemplo) y compartimiento de reserva (reticulocitos, segmentados y bandas).

BIOLOGÍA DE LA CINÉTICA MEDULAR

El término **proliferación** celular incluye, por lo general, los fenómenos de división, diferenciación y maduración de las células, y por lo tanto, implica aumento en el número, las propiedades y la función celular. **Diferenciación** es el proceso por el cual una célula en división da origen a una progenie que difiere de ella cualitativamente. **Maduración** se refiere a la especialización y al refinamiento funcional de las estructuras dentro de la célula (por ejemplo, segmentación de núcleo o síntesis de hemoglobina). Se inicia con la diferenciación, pero no requiere división celular.

El ciclo mitótico celular es la forma de división de las células del organismo. La célula se divide por mitosis, originando dos células hijas que entran en la llamada fase de reposo postmitótico. Se conoce como tiempo de generación al tiempo transcurrido entre el final de una mitosis y el final de la siguiente mitosis; es decir, el tiempo que tarda un ciclo completo. El período de síntesis dura nueve horas aproximadamente; el premitótico cuatro horas; el mitótico una hora; y el postmitótico diez horas (Figura N° 2).

La mitosis comienza en la profase, cuando la membrana nuclear se desintegra y la cromatina se arregla en cromosomas individuales, los cuales luego se duplican. Finalmente, se llega a la telofase, con la formación de dos células hijas, las cuales tienen tres opciones:

1. Pueden continuar dividiéndose (de G_1 a M).
2. Pueden dejar el ciclo celular y quedar como células en reposo o no reproductivas (G_0).

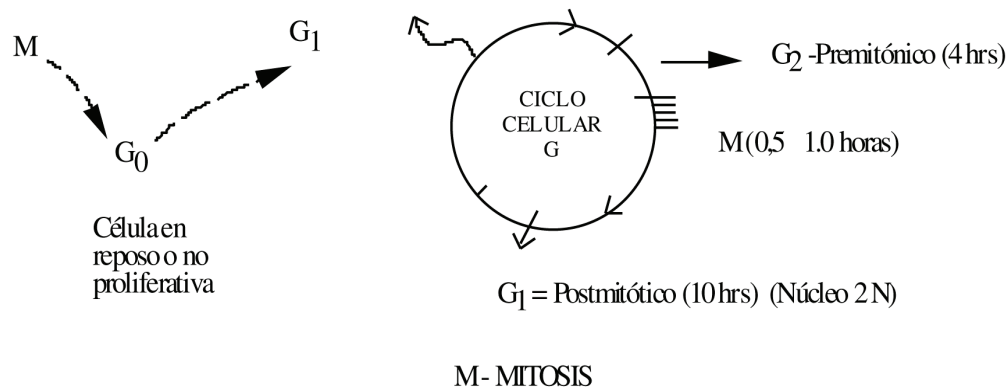


Figura N° 2. Ciclo de división celular (de mitosis a mitosis). Modelo del ciclo celular: G_0 , fase de reposo; S, fase de síntesis de ADN; G_1 , fase postmitótica y G_2 , estado postsintético.

3. Pueden proseguir con fenómenos de maduración hacia una línea celular determinada.

Las células que están en G_0 pueden reintegrar al ciclo celular si aparece un inductor o estímulo apropiado. Un cierto número de células (G_0 , G_1 , G_2) puede morir en los fenómenos de reproducción celular. En la Figura N° 2 se aprecian algunos otros aspectos del modelo de ciclo celular.

EL MICROAMBIENTE HEMOPOYÉTICO (MIH) (NICHOS CELULARES)

El inicio ecológico de la hematopoyesis implica al menos tres componentes, aparte del propiamente "parenquimatoso" o hemopoético: el estructural (microvasculatura, estroma), el humoral y el no estructural o celular. El tejido de la médula ósea es densamente celular y muy complejo, de carácter retículo vascular y esencial para la biología de las células germinales, al ser un área anatómica inductora y específica, en la cual se lleva a cabo la cinética vital de las células germinales (autorreplicación y diferenciación) y el desarrollo hemostático del resto de la hematopoyesis, hasta la salida de elementos a la circulación. Las posibilidades de acción del microambiente inductor de la hematopoyesis (MIH) se dan a través de la relación anatómica precisa de estructuras (celulares o no); por la secreción de productos estimuladores o de inhibidores por parte de las células de soporte; y por comunicación directa (química) entre las células del estroma (células de la adventicia, macrófagos, linfocitos, etc.) y las células germinales.

La microvasculatura del nicho ecológico posee un endotelio especial con oquedades murales, una membrana basal con una composición química semejante a la de las fibras reticulares y células de la adventicia o pericitos, de carácter reticular, que con sus extensas ramificaciones forman una verdadera armazón en asocio a fibras reticulares. La microvasculatura de la médula ósea es tan extensa que virtualmente toda la hematopoyesis es perivascular, situándose entre los senos venosos donde los distintos tipos celulares se ubican, topográficamente, en sitios específicos de acuerdo a su capacidad de desplazamiento. Las células adventicias cubren un 60% de la superficie exterior de los senos venosos y puede bajar a un 20% cuando existe un fuerte estímulo a la hematopoyesis. Los megacariocitos y la serie roja (eritrona), por lo general, se desarrollan sobre la superficie adventicial y son más perivasculares que la granulopoyesis. Esta última se desarrolla en la parte central de los espacios intersinusoidales, y por la capacidad de movilización que adquieren a medida

que maduran, pueden dirigirse hacia la proximidad del endotelio sinusoidal, al que finalmente atraviesan para pasar a la circulación sistémica. Las células linfoides no presentan una ubicación precisa y suelen distribuirse de manera irregular por todo el tejido hematopoyético. Los megacariocitos se localizan en la proximidad de los sinusoides de la médula ósea, cuya pared endotelial es atravesada por fragmentos de citoplasma megacariocítico, y mediante este paso transendotelial, alcanzan la luz sinusoidal y la circulación general.

La importancia del MIH es muy evidente, ya que se han descrito varias enfermedades que tienen su origen en un microambiente defectuoso; por ejemplo, la anemia congénita de Ershler, la neutropenia congénita de Kostman, ciertos casos de anemia aplásica, la mielofibrosis idiopática, la irradiación, el efecto deletéreo de anticuerpos o toxinas y la anemia de la enfermedad inflamatoria crónica. La patología hemopoética puede ser el resultado de anormalidades en el estroma o MIH o de la semilla (células germinales). En los cuadros N° 2 y N° 3 se reúnen algunas de las enfermedades de las células germinativas.

Cuadro N° 2. Enfermedades de la célula madre (a)

Transformación neoplásica

- | |
|--|
| a) Neoplasias mieloproliferativas: |
| a. Leucemia mieloide crónica Filadelfia (Ph) positiva. |
| b. Neoplasias mieloproliferativas crónicas Ph negativas. |
| i. Policitemia vera. |
| ii. Trombocitemia esencial. |
| iii. Mielofibrosis primaria. |
| b) Síndromes mielodisplásicos: |
| a. Anemia refractaria simple (AR). |
| b. AR con sideroblastos anillados. |
| c. AR con exceso de blastos I y II. |
| d. Citopenia refractaria con displasia unilineal. |
| e. Citopenia refractaria con displasia multilineal. |
| f. Síndrome mielodisplásico con del 5q. |
| c) Síndromes mielodisplásicos/mieloproliferativos: |
| a. Leucemia mielomonocítica crónica. |
| b. Leucemia mieloide crónica atípica. |

Cuadro N° 3. Enfermedades de la célula madre (b)

- | |
|----------------------------------|
| I. Deficiencia o daño funcional: |
| a. Anemia aplásica. |
| b. Neutropenia cíclica. |
| c. Otras neutropenias. |
| d. Mielosupresión inducida. |

Cuadro N° 3. Enfermedades de la célula madre (b)

II.	De células comprometidas:
a.	Síndrome de Diamond-Blackfan.
b.	Aplasia pura de serie roja.
c.	Anemias congénitas diseritropoyéticas.

La diferenciación implica una serie de eventos relacionados con el compromiso de una línea celular de sufrir procesos de maduración subsiguientes, lo cual se expresa en términos de determinado fenotipo celular y funcional. Por lo tanto, la diferenciación y la maduración comprenden decisiones genéticas que estarán sujetas a un complejo de “señales” de corto y largo alcance, intra o intercelulares. Tanto *in vivo* como *in vitro* se demuestra una íntima relación estructural entre el medio ambiente (estroma) y el tejido hemopoyético; de hecho, existe un verdadero complejo relacional intermembranoso. La diferenciación y la maduración son, por lo general y luego de la célula germinal, procesos simultáneos o concatenados: toda célula que se diferencia está destinada a madurar. Una célula indiferenciada (madre) posee un alto grado de potencialidad biológica. Una célula madura (menos indiferenciada) pierde esa potencialidad, pues se haya orientada hacia su destino biológico: engendrar progeñe madura.

Ahora bien, la diferenciación-maduración definitiva de las células sanguíneas que emergen de la médula ósea no es completa: los monocitos la terminan en el bazo, ganglios o en el tejido conectivo, en donde se convierten en macrófagos, células epiteliodes y células gigantes. Las plaquetas lo hacen en el bazo. Los eritrocitos salen como reticulocitos y terminan su maduración en el bazo.

Los linfocitos T llevan gran parte de su diferenciación en el timo (condicionamiento humoral y del medio ambiente), y los linfocitos B, al igual que los T, requieren una breve fase antígeno-dependiente antes de su maduración final (inmunológicamente competentes) y su entrada al compartimiento de linfocitos.

Regulación de la hematopoyesis. Citoquinas que estimulan la hematopoyesis

El funcionamiento normal de la hematopoyesis resulta de la interacción de mecanismos intracelulares y la influencia del microambiente donde se desarrollan las células hematopoyéticas. Este grupo de células es el responsable de la generación continua y de por vida de todas las demás células hemáticas. Son las células con la máxima capacidad de autorrenovación

y diferenciación, características que se van perdiendo conforme las células hematopoyéticas se diferencian en elementos más maduros. Las células madre hematopoyéticas son las únicas capaces de regenerar el sistema hematopoyético del receptor de un trasplante. Los estadios intermedios de desarrollo celular entre las células madre y las células hematopoyéticas maduras están constituidos por células que han sufrido restricciones en la capacidad de diferenciación, pero todavía no han adquirido los cambios morfológicos típicos de las células hemáticas maduras; son los progenitores comprometidos (que han sufrido cierta diferenciación hacia un tipo celular concreto, pero todavía no son células maduras). Características morfológicas distinguen a las células maduras con marcadores específicos que pueden ser analizados en la práctica médica.

Un avance capital en el estudio de la hematopoyesis fue el reconocer que las células madre germinativas eran incapaces de proliferar *in vitro*, a menos que se produjeran determinadas condiciones de estímulo. Este hecho llevó al reconocimiento de los factores estimulantes de colonias como responsables de la regulación hematopoyética. La acción de estos en el microambiente estimula o inhibe el crecimiento celular, induce la quiescencia o la proliferación y diferenciación de los progenitores hematopoyéticos primitivos y resulta en la progresión ordenada del sistema hematopoyético. Su acción puede ser local o circulante, como sucede con la eritropoyetina que responde a estímulos por retroalimentación.

La producción comercial de estos factores de crecimiento ha permitido su administración farmacológica, con el fin de estimular la producción y movilización de elementos progenitores desde la médula ósea hacia la sangre periférica. Con ello se ha favorecido la ejecución de trasplantes de células precursoras como método de tratamiento en enfermedades refractarias.

Actualmente es posible marcar, identificar o incluso separar los diferentes progenitores mieloides, por medio de anticuerpos monoclonales que detectan poblaciones específicas; por ejemplo, el ya conocido antígeno CD34 identifica a las células madre. Estas células corresponden aproximadamente al 1% de la población celular de la médula ósea. La enorme y diaria producción de granulocitos, monocitos, eosinófilos, basófilos, linfocitos, eritrocitos y plaquetas, involucra a un complejo mecanismo de regulación que permite a la médula ósea responder a distintas demandas, adecuando selectivamente la producción de las poblaciones celulares de acuerdo con las necesidades del organismo.

Varios factores han sido clonados y sintetizados por técnicas de ingeniería genética, como la interleucina 3 (IL-3), el factor estimulante de colonias granulocito-monocito (FEC-GM), el factor estimulante de colonias granulocíticas (FEC-G) y la eritropoyetina (Epo), que cumple funciones similares, limitadas a la serie eritroide cuando se usa clínicamente.

Factores inhibidores de la hematopoyesis

Estos factores disminuyen la proliferación de las células progenitoras (troncales o pluripotenciales), ya sea mediante la disminución de receptores de moléculas estimuladoras o a través de la supresión de la proliferación y de la formación de colonias hematopoyéticas. Entre ellos destacan: el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β), la proteína inflamatoria de macrófagos-1 α (MIP-1 α) y los interferones (IFN), entre otros.

Apoptosis

Las células sanguíneas requieren la presencia de los factores de crecimiento para mantenerse viables; el retiro de dichos factores induce a apoptosis (muerte celular programada).

Las vías moleculares que controlan la apoptosis permanecen encubiertas; sin embargo, se sabe que este fenómeno se encuentra regulado por factores tróficos, tanto en neuronas como en células hematopoyéticas. En estas últimas se ha demostrado que los factores de crecimiento FEC-GM, IL-3m FEC-G y eritropoyetina mantienen la supervivencia celular a través de la inhibición del rompimiento del ADN.

APLICACIONES TERAPÉUTICAS DE LOS FACTORES ESTIMULANTES DE COLONIAS

En principio, existen cuatro indicaciones generales para la administración de un factor de crecimiento hematopoyético:

1. Corrección de citopenias por deficiencia de un factor de crecimiento.
2. Estimulación de la recuperación de células madre y progenitoras hematopoyéticas que ocurren en estados de deficiencia natural o iatrogénica.
3. Incremento de la hematopoyesis para compensar la destrucción patológica y rápida de las células sanguíneas.
4. Activación de células hematopoyéticas maduras.

Aunque el uso de estos agentes se da en estados en que hay deficiencia de un determinado factor de

crecimiento (por ejemplo, la eritropoyetina en la anemia de la insuficiencia renal), en la actualidad, gracias a los resultados obtenidos en diversos estudios, se tiene evidencia de que estos grupos de agentes son eficaces en una amplia variedad de estados clínicos.

Los factores estimulantes de colonias (FEC) se agrupan bajo al menos cinco citocinas principales:

- γ **Eritropoyetina.**
- γ **FEC-G:** factor estimulante de granulocitos.
- γ **FEC-M:** factor estimulante de macrófagos.
- γ **FEC-GM:** factor estimulante de granulocitos-macrófagos.
- γ **Multi FEC:** factor multifuncional (también llamado interleucina 3: IL-3).

Eritropoyetina

La eritropoyetina o epoetina (EPO), producida en las células intersticiales del riñón (90%), como respuesta a los niveles del oxígeno corporal, es el factor estimulante de la diferenciación y la maduración de los precursores eritroides.

Su uso fue aprobado por la *Food and Drug Administration* (FDA) en 1989. En un inicio fue aprobado para utilizarse en el tratamiento de la anemia por insuficiencia renal crónica; sin embargo, su uso rápidamente se amplió a muchas otras causas, haciendo de este FEC uno de los productos más prescritos, con tecnología DNA recombinante.

En el cáncer, la anemia es frecuentemente multifactorial. Entre sus causas se encuentran la supresión de la hematopoyesis por el tumor, la mielosupresión inducida por quimioterapia y la anemia de la inflamación crónica. Esto ha confirmado la validez del tratamiento en pacientes con Hb $\leq$ 10 g/dl.

Aplicaciones de eritropoyetina

Las aplicaciones clínicas de la eritropoyetina están relacionadas con la insuficiencia productiva de los elementos eritroides, como consecuencia de una producción disminuida de eritropoyetina o directamente de la inhibición de la producción de eritrocitos. Las causas más frecuentes son:

- γ **Anemia de la insuficiencia renal crónica.** Se disminuye la producción de eritropoyetina.
- γ **Anemia en pacientes con SIDA tratados con anti-retrovirales,** como zidovudina.
- γ **Anemias secundarias a quimioterapia.** En neoplasias no linfoides, por efecto citostático en la médula ósea.

El uso de la EPO disminuye significativamente los requerimientos de sangre en pacientes dependientes de transfusión de eritrocitos.

FEC-G, FEC-M y FEC-GM

Estos factores de crecimiento hematopoyético son sustancias semejantes a las hormonas que estimulan a la médula ósea para que produzca células sanguíneas. El organismo produce naturalmente estas sustancias, pero gracias a la ingeniería genética se han encontrado métodos para producirlos en grandes cantidades fuera del organismo.

Los factores más utilizados son el factor estimulante de colonias de granulocitos (FEC-G) tipos Neupogen y Filgrastim, y el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (FEC-GM) tipos Leukine y Sargramostim. Ambos son glicoproteínas que regulan la hematopoyesis y la función de los leucocitos maduros, produciendo aumento: en la síntesis de citoquinas, de la capacidad fagocítica y del potencial patógeno, a consecuencia de la liberación de radicales libres y de citotoxicidad mediada por anticuerpos.

Los genes de la IL-3, FEC-GM y FEC-M se encuentran localizados en el brazo largo del cromosoma 5, cuyas alteraciones son características de ciertas leucemias, síndromes mielodisplásicos y mieloproliferativos. El gen del FEC-G se encuentra en el cromosoma 17, próximo sitio de ruptura de la translocación t (15; 17), característica de la leucemia promielocítica aguda. El receptor del FEC-M corresponde al producto del oncogén C-FMS, que comparte junto al receptor de IL-3 una actividad tirosinoquinasa.

La diferencia de respuesta hematológica entre FEC-G y FEC-GM no parece tener gran relevancia clínica. Como es de esperar, el FEC-G produce sobre todo incremento de neutrófilos; solo a dosis altas se observa un aumento de macrófagos. Los recuentos de eosinófilos no se ven afectados. El FEC-GM, por su parte, produce un incremento importante de neutrófilos; además, genera un aumento de macrófagos y eosinófilos. El resto de células blancas no se modifican en ningún caso.

Aplicaciones de los FEC

Neutropenia por quimioterapia

En procesos neoplásicos no mieloides, los FEC se utilizan después de cada ciclo. Desciende significativamente la incidencia de neutropenia febril y la necesidad de antibioterapia. Los mejores resultados se obtienen en regímenes quimioterapéuticos que poseen una incidencia de neutropenia febril superior

al 40%. La administración en cuadros declarados de neutropenia febril (junto con los antibióticos), no parece aportar gran beneficio clínico, salvo casos de neutropenia profunda y prolongada e infección grave.

Neutropenia por otros medicamentos

Los FEC-GM han demostrado eficacia en la neutropenia asociada a otros medicamentos no quimioterapéuticos.

Neutropenias crónicas

Los FEC pueden aumentar los recuentos de neutrófilos y disminuir la incidencia de infecciones en casos de neutropenia *cíclica, congénita o idiopática*. La eficacia y seguridad del tratamiento crónico está aún por determinar.

Trasplantes autólogos de médula ósea

El FEC-G ha demostrado que puede reducir de manera significativa la duración de la neutropenia y las complicaciones asociadas, en pacientes con neoplasia maligna no mielode sometidos a trasplante autólogo o alogénico de médula ósea; esto, principalmente, al acelerar la recuperación de la función mielode. La cifra de 500 neutrófilos o más por μl se alcanza a los 18 días, comparado con 24 días con placebo. Se reduce la incidencia de episodios febriles y necesidad de antibióticos, aunque queda un periodo de alto riesgo en las primeras semanas. El tratamiento no afecta a la producción de eritrocitos o plaquetas, por lo que siguen haciéndose necesarias las transfusiones.

Anemia aplásica y síndromes mielodisplásicos

Los resultados son positivos, pero no demasiado satisfactorios. En anemia aplásica pueden responder bien los casos leves a moderados, aunque en todos los casos el efecto es transitorio y obliga al tratamiento crónico; incluso, algunos investigadores han utilizado los FEC como factor pronóstico, al indicar que los que no responden a estos tendrán mala respuesta a la gammaglobulina antitimocítica. En los síndromes mielodisplásicos no se ha observado beneficio significativo.

FEC-GM recombinante humano (FEC-GMrh)

Se han obtenido varios productos de FEC-GMrh, empleando la tecnología del DNA recombinante en sistemas de expresión en bacterias, levaduras y mamíferos.

Indicaciones clínicas

Debido a su capacidad para estimular la producción

mieloide, se utiliza en paciente mielosuprimidos, pero su mayor utilidad se da en el campo del trasplante de células progenitoras, dado que la infusión del FEC-GMrh produce un incremento dosis dependiente entre 7 y 10 veces en el número de polimorfonucleares, monocitos y eosinófilos, que empieza en la primera semana por aumento de la proliferación y diferenciación en la médula ósea; después de suspender el tratamiento, las líneas mieloides entran en una fase inactiva de rebote. Además, los progenitores de todas las líneas hematopoyéticas se incrementan en la sangre entre 3 y 20 veces después de la aplicación prolongada, por lo cual se pueden cosechar células para realizar trasplante autólogo.

En el presente, la principal modalidad en la recolección de células madre para trasplante es la infusión de células progenitoras hematopoyéticas que circulan en sangre periférica, y pueden ser recolectadas por medio de aféresis. Esta técnica puede ser de utilidad en aquellos pacientes receptores de radioterapia extensa o que tienen compromiso de la médula ósea por su tumor, o en donde el médico tratante decida recoger células madre de sangre periférica en vez de médula ósea directamente, para evitar ciertos inconvenientes que presenta la extracción de sangre de médula ósea y el no poder seleccionar únicamente células mononucleares cuando se efectúa este tipo de procedimiento, que sí se puede realizar cuando es por aféresis; además, porque se ha observado mayor efecto de injerto contra tumor. Se ha demostrado que tras la quimioterapia, en el período posterior a la aplasia, se produce un efecto de entrada en el ciclo de los progenitores de la médula. Este reclutamiento puede ser amplificado si luego de la quimioterapia (ciclofosfamida) se administra FEC-GM, con lo cual se mejora cuali-cuantitativamente el inóculo.

La opción del trasplante de células precursoras procedentes de cordón umbilical (TCU), es considerada en pacientes que necesitan un trasplante alogénico y que carecen de donante familiar compatible. El principal inconveniente radica en que el número de progenitores existentes en un cordón umbilical es limitado. Los factores de crecimiento FEC-GM o FEC-G y las células CD34 haploidénticas son de gran utilidad para reducir al mínimo el periodo de aplasia.

Aunque las células leucémicas mieloides y de otras neoplasias pueden expresar receptores para el FEC-GMrh, no hay evidencia convincente que indique que cualquiera de estos factores causa transformación maligna o agrava el curso de las leucemias. A pesar de que se emplean en pacientes leucémicos y con mielodisplasia que presentan neutropenia severa, no se ha observado activación de la enfermedad o

su transformación leucémica. Los efectos adversos desaparecen rápidamente con la suspensión de la terapia.

BIBLIOGRAFÍA

Ali SM, Brown RA, Adkins DR, Todd G, Haug JS, Goodnough LT, DiPersio JF. Analysis of lymphocyte subsets and peripheral blood progenitor cells (PBPC) in apheresis products from normal donors mobilized with either G-SCF or concurrent G-CSF and GM-CSF. *Blood* 1997; 90: 2511-2515.

Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ (editores). *Williams hematology*. 5 ed. New York: McGraw-Hill Inc.; 1995.

Bodey G, Anaissie E, Gutterman J, Vadhan-Raj S. Role of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor as adjuvant therapy of fungal infection in patients with cancer. *Clin Infect Dis* 1993; 17: 705.

Castañeda Huerta JE. Leucemia linfoblástica aguda. *Revista Médica MD* 2009; 4(1) (Versión en Internet). Consultado en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/revmed/md-2009/md094c.pdf>

Cutler C, Antin J. An overview of haematopoietic stem cell transplantation. *Clin Chest Med* 2005; 26: 517-521.

Diss ML, Bernhard H, Shiota FM, Hand SL, Gralow JR, Huseby ES, *et al.* Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: an effective adjuvant for protein and peptide-based vaccines. *Blood* 1996; 88(1): 202-210.

Emerson S. Hematopoiesis and the hematopoietic growth factors. En: McClatchey KD (editor). *Clinical laboratory medicine*. 2 ed. Philadelphia: Lippincott William & Wilkins; 2002. p. 789-796.

Fleischmann J, Golde DW, Weisbart RH, Gasson JC. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhance phagocytosis of bacteria by human neutrophils. *Blood* 1986; 67: 708-712.

Florensa L, Woessner S. Hematopoyesis. Morfología de los elementos formes de la sangre y órganos hematopoyéticos. En: Sans Sabrafen J, Besses Raebel C, Vives Corrons JL. *Hematología Clínica*. 5 ed. España: Elsevier S.A.; 2007. p. 1-32.

Hara H, Ohe Y, Noguchi K, Nagai K, Tsuyama K, Kitamura Y. Presence of pluripotent haematopoietic precursors in vitro (CFU-Mix) in haematopoietic tissues from mice of W/Wv genotype. *Cell proliferation* 1982; 15(1): 25-29.

Konwalinka G, Peschel C, Boyd J, Geissler D, Ogris M, Odavic R, *et al.* A miniaturized agar culture system for cloning human erythropoietic progenitor cells. *Exp Hematol* 1984; 12(1): 75-79.

Konwalinka G, Peschel C, Geissler D, Boyd J, Tomaschek B, Odavic R, Braunsteiner H. Myelopoiesis of human bone marrow cells in a micro-agar culture system: Comparison

of two sources of colony stimulating activity (CSA). The International Journal of Cell Cloning 1983; 1(5): 401-411.

Mayani H, Flores-Figueroa E, Pelayo R, Montesinos JJ, Flores-Guzmán P, Chávez-González A. Hematopoyesis. Cancerología 2007; 2: 95-107.

Metcalf D. The molecular biology and functions of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. Blood 1986; 67(2): 257-267.

Montoya C, Ayala A. Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-FEC); propiedades generales y aplicaciones terapéuticas. Revista de la Asociación Colombiana de Alergia, Asma e Inmunología 2001; 10(1).

Montoya Guarín CJ, Ayala Mendoza AM. Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (Gm-Csf): propiedades generales y aplicaciones terapéuticas. Revista de Inmunología 2001; 10(1). (Versión en Internet) Colombia. Consultado en: <http://www.encolombia.com/medicina/revistas-medicas/alergia/vol-101/alergiavol10-001rev-factor/>

Montoya-Guarín C, Ayala-Mendoza A. Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos. Uso en enfermedades infecciosas. Revista de Inmunología 2001; 10(1). (Versión en Internet). Colombia. Consultado en: <http://www.encolombia.com/medicina/revistas-medicas/alergia/vol-101/alergiavol10-001rev-factor2>

Ramírez Orellana M, Cornejo Gutiérrez AM. Fisiología de la hematopoyesis. Pediatr Integral 2004; 8(5): 377-382.

Schrader JW. Stem cell differentiation in the bone-marrow. Immunol Today 1981; 2(1): 7-12.

Tejido hematopoyético. (Versión en Internet). Consultado en: http://iespoetaclaudio.centros.educa.jcyl.es/sitio/upload/11.hematopoyesis_1bach.pdf

Tormo Díaz M, Prósper Cardoso F. Capítulo 1.16. Trasplante de células hematopoyéticas. Terapia génica. En: Díaz Rubio E, García Conde J. Oncología clínica básica. Madrid: Arán Ediciones S.A.; 2000. p. 229-246.

Zambrano Ramírez IR, Santiago Osorio E, Weiss Steider B, Cáceres Cortés JR. Biología de las células totipotenciales hematopoyéticas. Rev Invest Clin 1999; 51(1): 53-68.

2

ESTRUCTURA Y PAPEL BIOLÓGICO DE LA HEMOGLOBINA

Dr. Luis F. Rojas Solano
Dr. Luis A. Mora Bermúdez

INTRODUCCIÓN

El paso de la vida anaeróbica a la aeróbica significó un gran cambio evolutivo, porque permitió a los organismos mejorar el rendimiento energético de su maquinaria metabólica. Esto significa que los seres vivos aprendieron a utilizar el oxígeno (O_2) para desarrollar un metabolismo aeróbico capaz de generar la energía que ellos requerían para satisfacer sus necesidades energéticas. Sin embargo, para los animales superiores esto significaba introducir cambios anatómo-fisiológicos y fue así como se desarrollaron los sistemas respiratorio y circulatorio. Bioquímicamente, el cambio más importante fue el desarrollo de mecanismos celulares, que hicieron posible la síntesis de una molécula capaz de transportar el O_2 desde los pulmones hasta los tejidos, valiéndose para ello de la sangre y de las moléculas transportadoras de electrones, que permiten el funcionamiento de la cadena respiratoria mitocondrial, donde, en última instancia, se utiliza el O_2 .

LOS PIGMENTOS RESPIRATORIOS

Con el nombre de pigmentos respiratorios se designa a una familia de proteínas coloreadas que se encargan del transporte de O_2 o de electrones en distintas especies animales. En el ser humano la primera función es efectuada por la *hemoglobina* (Hb) y la segunda por los *citocromos*, ambos de color rojo. En otras especies existen pigmentos de otros colores y estructuras, como las *clorocruorinas*, las *eritrocruorinas* y las *hemocianinas*.

LA HEMOGLOBINA

Estructura

Tanto la hemoglobina como los citocromos son proteínas conjugadas, es decir, proteínas que por hidrólisis liberan, además de aminoácidos (AAs), un componente estructuralmente diferente que se conoce con el nombre de *grupo prostético*, término derivado de la voz griega *prótesis*, que significa grupo adicional. En este caso, el grupo prostético recibe el nombre de grupo *hem*.

En cuanto a su estructura, se sabe que el grupo hem es una molécula tetrapirrólica cíclica, de naturaleza porfirínica, de color rojo, que alberga en el centro de su estructura a un átomo de hierro (Fe) que puede tener valencia fija de +2, como ocurre en la Hb, o que oscila entre +2 y +3, como ocurre en los citocromos. A las proteínas cuyo grupo prostético es el hem, se les llama *hemoproteínas*, y entre ellas destacan, además de la Hb y los citocromos, la *mioglobina* (Mb), la *catalasa*, las *peroxidasas*, la *triptofano pirrolasa* y la *xantina oxidasa*.

El hecho estructural fundamental de todas las proteínas consiste en que los AAs que forman sus largas cadenas, se unen entre sí por medio de un *enlace peptídico*. La idea de este enlace, de carácter covalente fuerte, fue propuesta en 1901, por los químicos alemanes Fischer y Hofmeister.

Existen proteínas que están constituidas por una cadena única, es decir, por un número más o menos grande de AAs unidos por dicho enlace (estructura polipeptídica única). Otras, en cambio, están formadas por varias cadenas, no necesariamente iguales, unidas entre sí por enlaces especiales de tipo no covalente. Un buen ejemplo de esto lo constituyen las tres variedades de Hb presentes en la sangre de toda persona adulta: la hemoglobina A (HbA), la hemoglobina A_2 (HbA₂) y la hemoglobina fetal (HbF). Cada una de ellas está formada por cuatro cadenas polipeptídicas de dos tipos diferentes. Así, la HbA₁, predominante después de los seis meses de edad, está formada por dos alfa (α) y dos beta (β) ($\alpha_2\beta_2$), la HbA₂ por dos alfa y dos delta ($\alpha_2\delta_2$) y la HbF por dos alfa y dos gamma ($\alpha_2\gamma_2$). Esta designación no tiene ninguna relación con las estructuras de alfa hélice, propuesta por Pauling para las proteínas globulares, o con la estructura beta o de hojas plegadas presente en otras proteínas de carácter fibroso. Cada cadena hemoglobínica tiene un grupo prostético hem, de modo que cada una constituye una proteína conjugada.

El desarrollo del tetrámero constituye el hecho más significativo en la evolución de la Hb, porque es esencial para su función respiratoria. De aquí que se encuentre el mismo arreglo estructural en las sangres

de todos los vertebrados, con excepción de algunas especies como la lamprea.

El arreglo espacial de las cuatro cadenas polipeptídicas de la Hb, es decir, su *estructura cuaternaria*, le confiere a esta proteína una forma tetraédrica, con dimensiones de 6,4 X 5,5 X 5,1 nm. De modo que se le considera como una proteína globular, compacta, de ordinario muy soluble en la fase acuosa de las células que la albergan y cuyo peso molecular es de 68 KD.

Parte proteica de la hemoglobina

Todas las proteínas están formadas, en términos generales, por los mismos AAs, unos veinte, que al formar el enlace peptídico van quedando unidos de manera que el grupo carboxilo de uno reacciona con el grupo amino del otro, con pérdida de una molécula de agua (H_2O). Lo que queda de cada AA se llama *residuo*. De todos ellos, en la HbA₁ se encuentran 18, como se indica en el Cuadro N° 1.

Cuadro N° 1. Aminoácidos presentes en las cadenas polipeptídicas de la HbA ₁			
Nombre del Aminoácido	Abreviatura	N° de residuos en la cadena α	N° de residuos en la cadena β
Ácido aspártico	asp	10	40
Ácido glutámico	glu	4	6
Alanina	ala	21	15
Arginina	arg	3	3
Asparagina	asp-NH ₂	2	3
Cisteína	cis-SH	2	2
Fenilalanina	fenilala	7	8
Glicina	gli	7	8
Glutamina	glu-NH ₂	---	5
Histidina	his	10	9
Isoleucina	isoleu	---	---
Leucina	leu	18	18
Lisina	lis	11	11
Metionina	met	2	1
Prolina	pro	7	7
Serina	ser	11	5
Tirosina	tir	3	3
Treonina	treo	9	7
Triptofano	tri	13	18
Valina	Val	13	18
Totales		141	146

Sabiendo que todas las proteínas están formadas por los mismos AAs, ¿a qué se deben las diferentes propiedades físicoquímicas y biológicas de estas moléculas? En primer lugar, al número total de residuos de AAs; en segundo lugar al número de residuos de cada clase particular de AA, y en tercer lugar, al orden en que esos residuos estén colocados en las cadenas polipeptídicas, es decir, de la *estructura primaria* de cada cadena.

Las cadenas α y β están formadas por 141 y 146 residuos de AAs, respectivamente, y ambas tienen

estructura y tamaño sorprendentemente parecido al de la Mb, proteína que le confiere el color rojo al tejido muscular esquelético, por lo que se le llama Hb muscular. Tanto la Mb como las cadenas β tienen segmentos helicoidales en el 75% de su longitud, los cuales están señalados con las letras A, B, hasta H, como se ilustra en la Figura N° 1. Esto ha dado lugar a una nomenclatura especial de los residuos de AAs presentes en esos segmentos, que se conoce como notación helicoidal de Kendrew. De tal forma, el primer residuo del segmento helicoidal A se designa como A1, el segundo como A2 y así sucesivamente.

Ambas proteínas tienen también cinco segmentos no helicoidales ubicados entre las hélices; el segmento CD, por ejemplo, está localizado entre las hélices C y D.

No se ha explicado claramente por qué se interrumpe la estructura helicoidal en ciertos puntos de las cadenas hemoglobínicas. Se sabe que un factor importante es la presencia, en algunos de esos puntos, de residuos de prolina. El anillo de cinco átomos de la pirrolidona presente en ese AA, no puede crear puentes de hidrógeno, una vez que se encuentra formando parte de la estructura primaria de una proteína. En la molécula de Mb hay solo cuatro residuos de prolina;

sin embargo, existen ocho interrupciones de la secuencia de alfa hélice.

Tanto el interior como el exterior de las cadenas están bien definidos. El interior consiste casi enteramente de residuos no polares como la leucina, la valina, la metionina y la fenilalanina. En el caso de los residuos que tienen una porción polar y otra no polar, esta última se sitúa en el interior. Los únicos residuos polares que se encuentran en el interior de la molécula son dos residuos de histidina que juegan un papel crítico en el funcionamiento de la Hb.

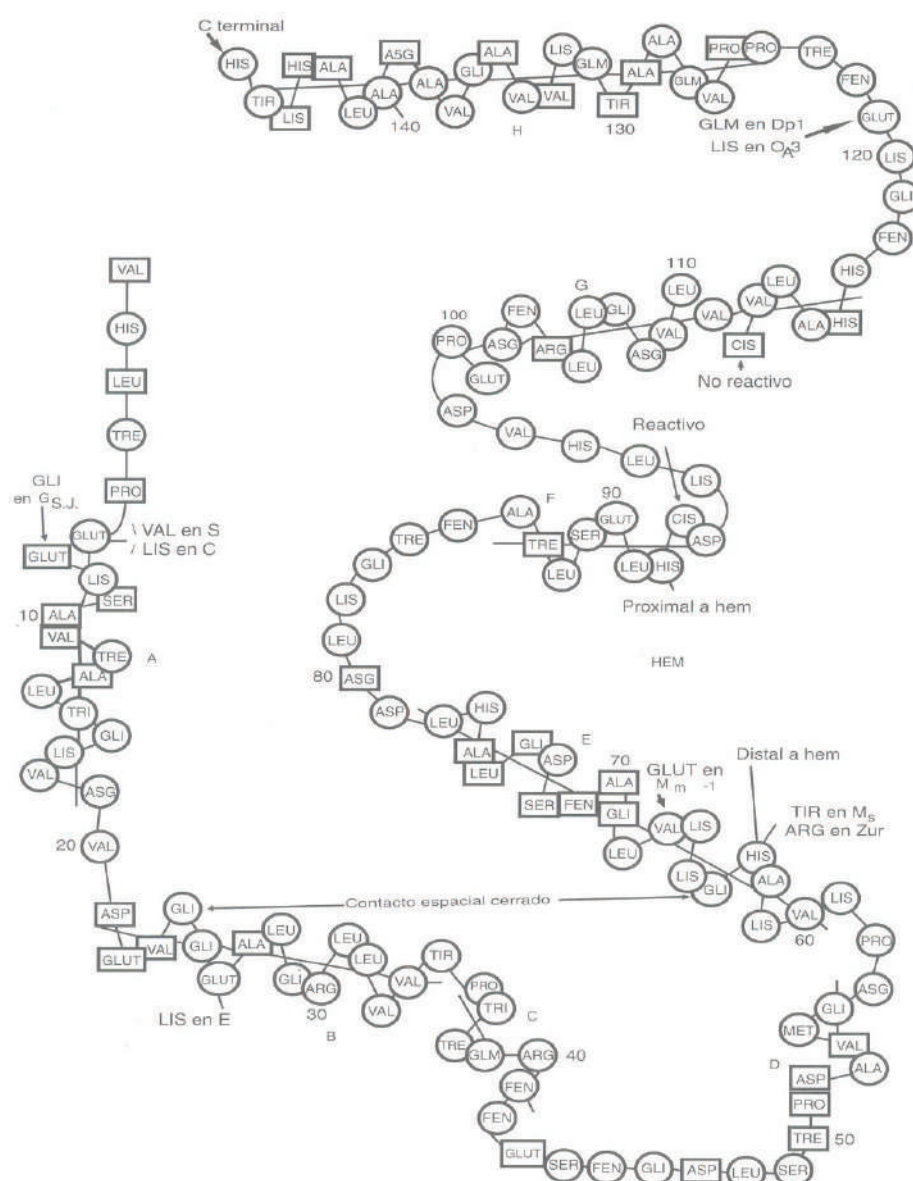


Figura N° 1. Representación esquemática de la cadena β de la hemoglobina humana.

Parte no proteica de la hemoglobina

El grupo prostético de cada cadena se localiza en un repliegue que provee al ambiente de una baja constante dieléctrica. Aquí los grupos vinilo de la protoporfirina IX (Proto IX) que son hidrofóbicos, están rodeados de residuos de aminoácidos con características semejantes. Por otra parte, los dos radicales propionato de la porfirina, que tienen carga negativa al pH fisiológico, se encuentran en la cercanía de nitrógenos cargados positivamente, correspondientes a residuos de lisina y de arginina.

El Fe del hem está coordinado con el nitrógeno terciario del anillo imidazol del residuo de histidina, llamado proximal (el N° 87 de las cadenas α y el 92 de las cadenas β , o el F8 en ambas cadenas). Sin embargo, los cuatro grupos hem se ubican cerca de la superficie externa de la molécula tetramérica, lo que facilita su combinación con el O_2 .

Cada una de las cadenas polipeptídicas de la Hb está dotada de tres "niveles" de organización estructural: primaria, secundaria y terciaria. Ahora bien, las cuatro cadenas "unidas" forman la estructura cuaternaria de la molécula de Hb. Los enlaces que hacen posible este arreglo tetramérico son de tipo "secundario", no covalente, a saber: puentes de hidrógeno, enlaces salinos, enlaces hidrofóbicos y otros que caen dentro de la clase de enlaces de van der Waals, en este caso extensos.

GENÉTICA Y SÍNTESIS DE LAS CADENAS POLIPEPTÍDICAS

La síntesis de las cadenas se realiza primero en los eritroblastos diferenciados de la médula ósea y continúa por un corto período en los reticulocitos anucleados circulantes. Los eritrocitos que maduran no tienen la capacidad bioquímica para llevar a cabo esta síntesis, dado que han perdido su núcleo y, con él, la información genética para hacerlo. Los proeritroblastos ya contienen en su citoplasma pequeñas cantidades de ácido ribonucleico mensajero (ARNm), correspondiente a las distintas cadenas hemoglobínicas y aunque no se tiñen con bendicidina, es de suponer que ya tienen la capacidad para sintetizarlas y ensamblarlas para formar el tetrámero.

La biosíntesis de la Hb guarda estrecha relación con la eritropoyesis. La expresión genética y el contenido de Hb acompañan la diferenciación de las unidades formadoras de colonias eritroides (UFC-E) en los precursores eritroides. Cada una de las cadenas polipeptídicas de la Hb cuenta con genes propios: α , β , γ y δ . Los genes α y β son independientes y se ubican en cromosomas distintos (Figura N° 2). El grupo α se localiza en el brazo corto del cromosoma 16 y contiene además los codificadores para las cadenas ζ . Como puede observarse, ambos genes están por duplicado (este hecho es fundamental para comprender los diferentes tipos de α talasemia). El grupo β se localiza en el brazo corto del cromosoma 11 e incluye los genes γ , δ y ϵ .

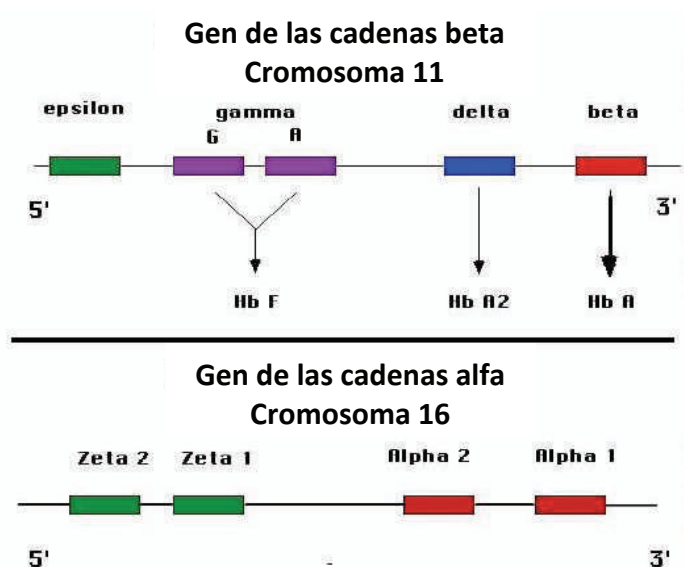


Figura N° 2. Ubicación de los genes para la síntesis de las globinas.

Todos los genes funcionales de la globina comparten una estructura general que consiste en tres exones o secuencias codificadoras y dos intrones o sectores interpuestos (secuencias que no traducen). La biosíntesis de las cadenas polipeptídicas que conforman la molécula de Hb se efectúa siguiendo los lineamientos que rigen la síntesis de cualquier otra proteína. Así, una vez que se efectúa la traducción del mensaje genético, el aparato ribosomal de síntesis se encarga del ensamblaje de cada una de las cadenas, siguiendo la secuencia de los codones o unidades codificadoras presentes en su ARNm correspondiente. Luego, se efectúa una fase o etapa de iniciación, seguida de una de alargamiento para rematar con la de finalización.

El genoma “temprano” o primitivo de las células eritroides humanas tiene la información necesaria para realizar la síntesis de otras cadenas polipeptídicas. Estas cadenas pueden arreglarse en forma tetramérica para formar las Hbs *embrionarias*: Gower 1, Gower 2 y Portland. Los genes responsables de la síntesis de estas cadenas, llamadas theta (θ) y épsilon (ϵ), llegado un momento quedan reprimidos y dan paso a la expresión de los genes que albergan la información para la síntesis de las cadenas α , β , γ y δ .

Hacia la quinta semana de gestación, las Hb Gower 1 ($\alpha_2\epsilon_2$) y Gower 2 ($\alpha_2\epsilon_2$) constituyen el 42% y el 24%, respectivamente, de la Hb total, y el resto lo constituye la HbF. Aunque se trata de Hbs primitivas, ya tienen carácter tetramérico, estructura fundamental para hacer posible un adecuado transporte de O_2 . Lo anterior también sugiere que eso es posible por la semejanza de esas cadenas con las de la Hb del adulto. Hacia la décima semana de gestación, cuando el hígado se ha convertido en el centro de la eritropoyesis, las cadenas α y γ (HbF) constituyen la mayor parte de la Hb sintetizada.

La síntesis de las cadenas β se inicia antes de la semana décima, pero solo alcanza valores significativos antes del nacimiento, a medida que declina la síntesis de cadenas γ . Cuando nace el ser humano tiene cerca de 15% de HbA₁ y el resto es prácticamente HbF. Sin embargo, después de los seis meses de edad, se alcanzan los valores del adulto; de modo que el cuadro hemoglobínico sería, en términos generales, el siguiente: HbA₁ = 96%, HbA₂ = 3% y HbF = 1%.

EL GRUPO PROSTÉTICO DE LA HEMOGLOBINA

El grupo prostético o grupo adicional de las hemoproteínas corporales, entre las cuales se encuentra la Hb, es una estructura orgánica, diferente

de los aminoácidos que forman la parte proteica: nos referimos a ella como grupo *hem* (algunos lo llaman hemo y otros heme). Esta estructura constituye un *quelato*, es decir, un conjunto formado por una parte orgánica y un ión metálico. La palabra quelato deriva de un término griego que se refiere a las tenazas de la langosta. En nuestro quelato la parte orgánica es la *protoporfirina IX*, mientras que el ión metálico es un ión de hierro divalente.

El grupo hem es un derivado porfirínico

Las porfirinas son moléculas formadas por cuatro anillos de características pirrólicas, es decir, que se parecen al compuesto llamado pirrol, unidos entre sí por átomos de carbono. Para fines estructurales y de nomenclatura se les considera derivados de una molécula hipotética que se llama *porfina*, cuya estructura se ilustra en la Figura N° 3.

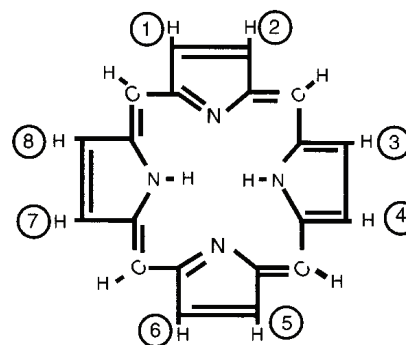


Figura N° 3. Estructura de la porfina.

Si los átomos de hidrógeno ubicados en las posiciones marcadas con los números del 1 al 8 en la Figura N° 3 son sustituidos por diferentes ligandos, se obtienen las porfirinas naturales. Si se colocan cuatro residuos de acetato y cuatro de propionato, tenemos la serie de las uroporfirinas. Si se colocaran ahora cuatro metilos y cuatro propionatos tendríamos la de las coproporfirinas; pero si se colocan cuatro metilos, dos vinilos y dos propionatos, se formaría la serie de las protoporfirinas (Figura N° 4). Las dos primeras series dan lugar a cuatro isómeros de posición posible (metámeros), y la última forma a quince isómeros. De estos el que más interesa es el número nueve y por eso se designa con el nombre de Protoporfirina IX, que E. Fischer sugirió al estudiarlo.

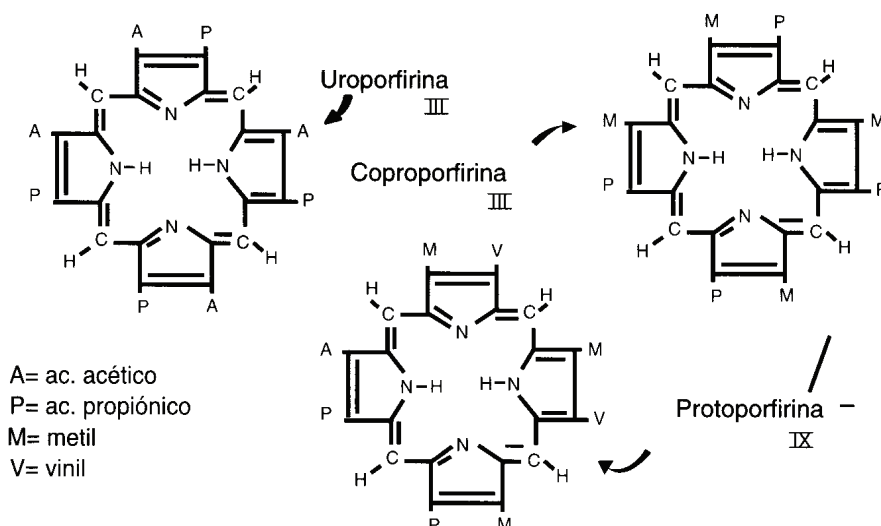


Figura N° 4. Tres porfirinas humanas.

Las porfirinas son moléculas planas y muy estables. Dicha estabilidad se debe a la energía de resonancia derivada del sistema de dobles enlaces conjugados, característico del arreglo tetrapirrólico, idea propuesta en 1915 por el químico alemán Küster. Una propiedad química muy importante de las porfirinas consiste en la formación de quelatos con los iones metálicos, sobre todo de los metales de transición. De ellos los más relevantes desde el punto de vista biológico son los formados por el hierro, el magnesio y el cobalto. Los de hierro, representados por la ferroprotoporfirina IX, constituyen el grupo prostético de la Hb, la mioglobina, los citocromos, la catalasa y las peroxidasas, que pertenecen a la familia de las hemoproteínas corporales. Un quelato de magnesio forma la molécula de clorofila y los de cobalto forman la familia de los compuestos corrinoideos, entre los cuales se encuentra la vitamina B₁₂.

Biosíntesis del grupo hem

La biosíntesis del grupo hem se efectúa prácticamente en todas las células del organismo, ya que constituye el grupo prostético de proteínas conjugadas que son fundamentales para la vida. La estructura básica de las porfirinas consiste de un anillo formado por cuatro heterociclos de características pirrólicas. Todos los átomos de carbono de ese anillo provienen del aminoácido más pequeño de los veinte que constituyen las proteínas: la glicina, y de un derivado metabólico, integrante del ciclo de Krebs, conocido como succinil-coenzima A (succinil-CoA). Para que la síntesis se lleve a cabo, se necesitan además dos vitaminas que participan formando parte estructural de dos coenzimas. Estas vitaminas son el *ácido pantoténico*, que forma parte de la coenzima A, y

la *piridoxina*, que actúa bajo la forma de fosfato de piridoxal. La vía de síntesis que conduce al hem es objeto de una regulación muy estricta por los mecanismos controladores de las células. Esto explica el hecho de que en condiciones normales muy poco o nada de los intermediarios de la síntesis se eliminan por la orina, por las heces o por ambas vías.

En las reacciones que se presentan a continuación, cada enzima se identifica por su nombre oficial y por su número de código, ambos avalados por la Comisión de las Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica.

Primera reacción: formación del ácido δ -aminolevulínico (A δ AL)

Enzima: SuccinilCo-A:glicina succinil transferasa (descarboxilante) EC 2.3.1.37

La primera reacción ocurre en la mitocondria celular y se considera que es la que determina la velocidad de la síntesis de las porfirinas. Está sujeta a un mecanismo de retroalimentación a cargo del producto final de la serie, es decir, el grupo hem. Esta reacción, que se ilustra en la Figura N° 5, es catalizada por la enzima normalmente llamada *sintetasa del ácido δ -aminolevulínico*. El ácido formado en esta reacción es considerado como el precursor alifático de las porfirinas. La enzima se localiza en la membrana interna de las mitocondrias y requiere de fosfato de piridoxal, como coenzima; sin embargo, en realidad es una transferasa y no una sintetasa. A estas enzimas que catalizan reacciones de síntesis, pero sin recurrir a cofactores energéticos como el ATP, se ha convenido en llamarlas *sintasas*.

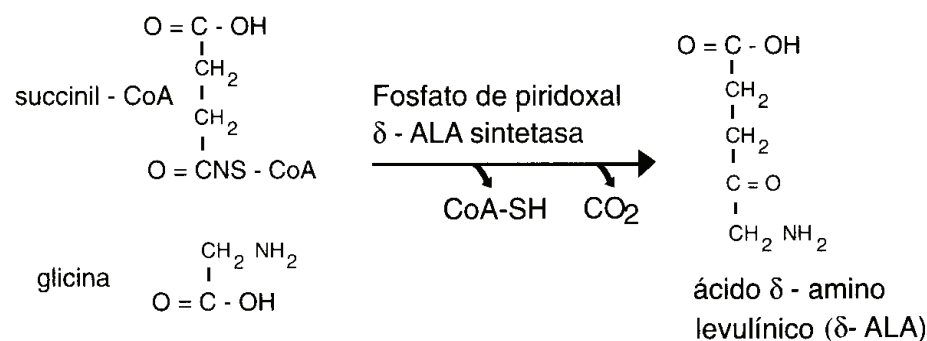


Figura N° 5. Formación del ácido δ -aminolevulínico.

Segunda reacción: formación del porfobilinógeno (PBG)

Enzima: δ -aminolevulinato hidrolasa EC 4.2.1.24

Esta reacción tiene lugar en el citosol de las células. Dos moléculas de A δ AL difunden hacia el exterior de las mitocondrias y una vez afuera se condensan con pérdida de dos moléculas de agua. El resultado es la formación de la primera molécula de características monopirrólicas, designada como *porfobilinógeno*, que se considera como el precursor cíclico monopirrólico de las porfirinas. La enzima se llama *PBG sintetasa* o A δ AL deshidratasa. 4.2.1.24. La enzima que cataliza esta reacción no solo es particularmente sensible a los iones de plomo, sino que se ha demostrado que requiere de iones de zinc para una completa activación.

Tercera reacción: formación de uroporfirinógeno I (urogeno I)

Enzima: *porfobilinógenoamoníacoliasa (polimerizante)* EC 4.3.1.8

El mecanismo bioquímico de esta reacción ha intrigado a los investigadores en este campo desde hace muchos años. Hoy en día se acepta que la enzima cataliza la condensación de cuatro moléculas de PBG para dar un tetrapirrol lineal, conocido como *hidroximetilbilano*. Aunque la enzima ha sido denominada como *uroporfirinógeno I sintetasa* (PBG desaminasa), se debe aclarar que este nombre se presta a confusión, pues la molécula de uroporfirinógeno I no es el producto de la reacción, sino el derivado del bilano.

Cuarta reacción: formación del uroporfirinógeno III (urogeno III)

Enzima: *uroporfirinógeno III cosintetasa*

Esta enzima, al igual que las dos anteriores, es citosólica. Cataliza un arreglo molecular que conduce a la formación del primer derivado tetrapirrólico de la

vía de síntesis del hem: el paso de hidroximetilbilano a uroporfirinógeno de la serie III. En ausencia de esta enzima el hidroximetilbilano se cicla en forma espontánea y produce el uroporfirinógeno I, un intermediario inútil para fines biosintéticos, pues esta serie isomérica no conduce a la síntesis del hem.

Quinta reacción: formación de coproporfirinógeno III (coprogeno III)

Enzima: *uroporfirinógeno descarboxilasa* EC 4.1.1.37

La enzima citosólica que cataliza esta reacción promueve la remoción secuencial de los grupos carboxilos de los cuatro grupos carboximéticos (o residuos del ácido acético) presentes en el urogeno III, que se convierten en metilos para dar el coprogeno III.

La descarboxilación ocurre gradualmente a través de los anillos pirrólicos. Esto explica la existencia de intermediarios heptacarboxílicos y pentacarboxílicos, antes de la aparición de la molécula de coproporfirinógeno IX (Figura N° 6).

Sexta reacción: Formación del protoporfirinógeno IX (protogeno IX)

Enzima: *coproporfirinógeno oxidasa*

La molécula de coprogeno IX reingresa a la mitocondria. Ahí se encuentra una enzima que cataliza la remoción de dos grupos carboxilos y dos hidrógenos de dos de las cuatro cadenas de ácido propiónico que tiene su sustrato, es decir el coprogeno. Estos residuos de propionato se encuentran en las posiciones 2 y 4 (anillos A y B), que al ocurrir la reacción quedan convertidos en residuos de vinilo. Al tener ahora la molécula tres tipos diferentes de sustituyentes, el número de isómeros posibles sube a 15. El que resulta de la reacción anterior es el metámero IX (Figura N° 6).

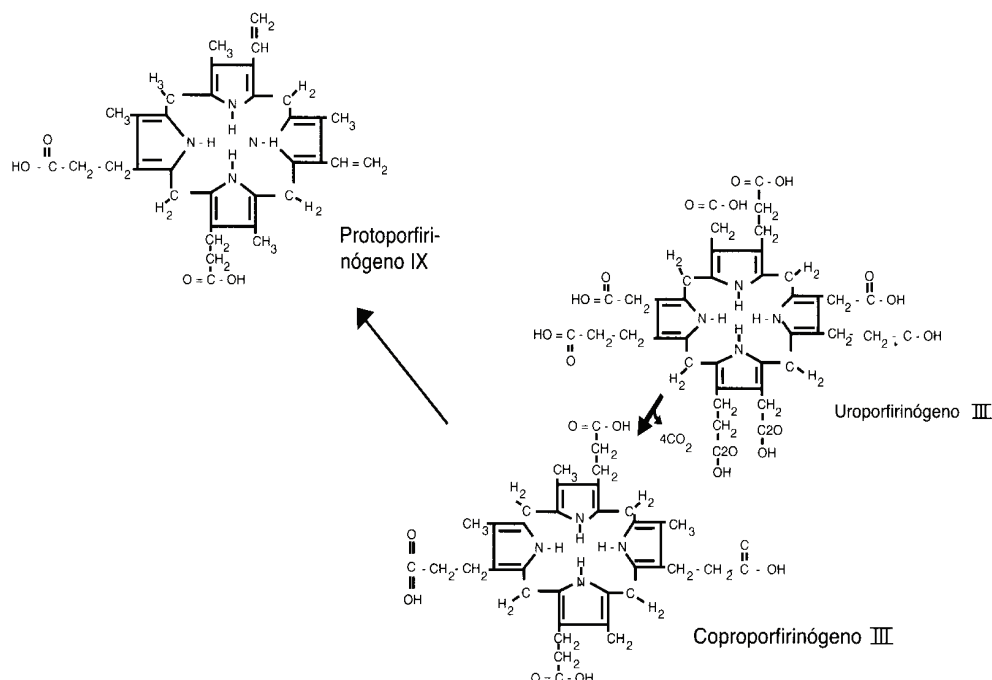


Figura N° 6. Formación de coproporfirinógeno y de protoporfirinógeno.

Sétima reacción: formación de la protoporfirina IX

Enzima: protoporfirinógeno oxidasa EC 1.3.3.4.

El penúltimo paso en la biosíntesis del grupo hem, es decir, la oxidación del protoporfirinógeno IX a protoporfirina IX, es catalizado por otra enzima mitocondrial, la protoporfirinógeno oxidasa, que cataliza la remoción de seis átomos de hidrógeno del corazón tetrapirrólico. Al ocurrir esta deshidrogenación, el sustrato, incoloro y no resonante, se torna de color rojo y adquiere configuración resonante.

Octava reacción: formación de la ferroprotoporfirina IX (grupo hem)

Enzima: protohem-ferroliasa EC 4.99.1.1

El paso final es la inserción del átomo divalente de hierro en la molécula de protoporfirina IX. La reacción es catalizada por una enzima mitocondrial conocida como *ferroquelatasa* o hem sintetasa, que se encuentra firmemente unida a la membrana interna de las mitocondrias. Esto significa que la biosíntesis del hem se inicia en la mitocondria y termina ahí mismo, con algunas reacciones intermedias de naturaleza citosólica (Figura N° 7).

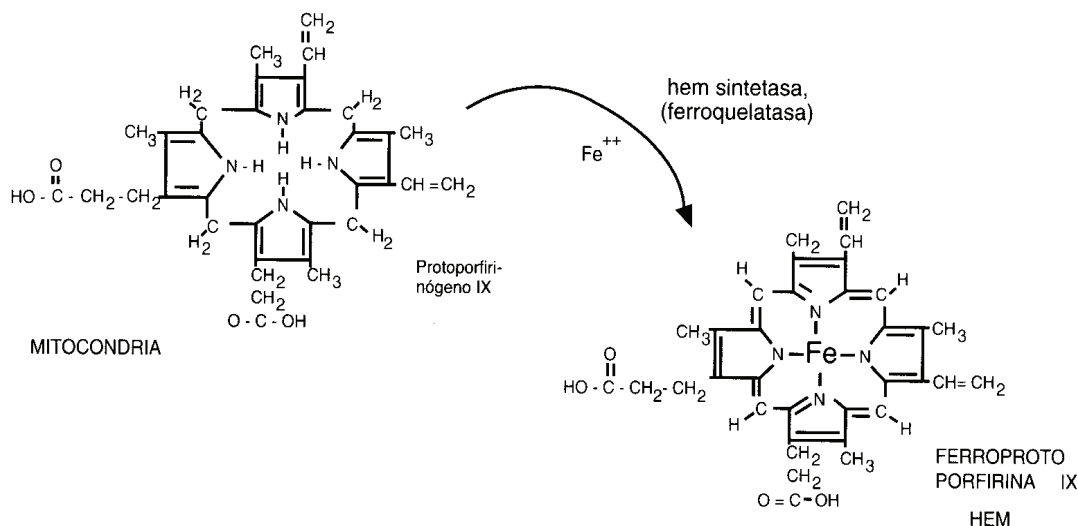


Figura N° 7. Reacción de la ferroquelatasa.

A diferencia de otras enzimas de la vía biosintética, la ferroquelatasa utiliza una porfirina como sustrato y no un porfirinógeno, que es una porfirina reducida. Además, cabe resaltar que el Fe que utiliza la enzima es el Fe^{2+} y no el férrico (Fe^{3+}), es decir, la forma reducida. Más bien, el Fe debe ser reducido dentro de la membrana mitocondrial, en un lugar muy cercano a donde se encuentra la enzima.

ENLACES IMPORTANTES EN LA MOLÉCULA DE HEMOGLOBINA

El átomo de Fe del grupo hem se une, gracias a su bivalencia, a los nitrógenos secundarios de dos anillos pirrólicos (el B y el D, o los anillos horizontales de la Figura N° 7). Utilizando dos enlaces secundarios o de coordinación, se une a los dos nitrógenos terciarios presentes en los anillos A y C, que son los de posición vertical. Con esto el Fe presenta una valencia aparente de 4, pero como su “índice de coordinación” es igual a 6, le quedan otras dos “valencias”, una que le permite unirse al nitrógeno terciario presente en los residuos de histidina “proximal”, el número 87 de las cadenas α y el 92 de las β (en ambas corresponde al residuo F8, según la notación helicoidal de Kendrew). La sexta valencia es la que le permite unirse a la molécula covalente del O_2 .

Los dos residuos de propionato del grupo hem poseen carga negativa, debido a que el pK de estos grupos carboxilo está por debajo del pH fisiológico. Estas cargas negativas establecen enlaces electrostáticos con grupos cargados positivamente, correspondientes a AAs de características básicas, como la lisina y la arginina, ubicados en las cadenas polipeptídicas. Esto explica el por qué de la importancia de la estructura primaria de estas cadenas. A eso debe agregarse el hecho de que el grupo hem se encuentra ubicado en un ambiente de baja constante dieléctrica, por la cercanía de aminoácidos hidrofóbicos. Aquí resulta difícil la pérdida de electrones por el átomo de Fe, o dicho de otro modo, es muy difícil de oxidar, y esto le permite mantener su estado divalente o reducido, lo que es fundamental para mantener libre la sexta valencia en donde se une el O_2 . El grupo hem aislado y disuelto en agua experimenta una rápida oxidación en su átomo de Fe, el cual con valencia +3 no puede llevar a cabo el transporte de O_2 . El ambiente hidrofóbico se mantiene por la constancia en los residuos de AAs que lo forman. Esta es otra razón por la que la estructura primaria de las cadenas hemoglobínicas es tan importante.

ERRORES INNATOS DEL METABOLISMO DE LA HEMOGLOBINA

En lo que respecta a los errores innatos del metabolismo de la hemoglobina, se pueden considerar dos categorías: las relacionadas con la parte proteica o **hemoglobinopatías** y las que afectan al grupo prostético o **porfirias**.

Las hemoglobinopatías

En 1904, James Herrick describió un cuadro particular en un joven negro que había sido admitido en el hospital por sufrir de tos, fiebre, anemia, cefalea, debilidad, ligero tinte amarillento en los ojos y en las membranas mucosas. El frotis de la sangre periférica evidenció eritrocitos de morfología variada; sin embargo, los que atrajeron más su atención fueron aquellos delgados y en forma de hoz. Anotó entonces que lo más sobresaliente era el cuadro hematológico. A su reporte siguieron otros y apareció entonces en la literatura médica el término “*sickle cell anemia*”, anemia de las células en forma de hoz o anemia drepanocítica, para referirse a este cuadro.

Casi medio siglo después, en 1949, Linus Pauling y sus colaboradores reportaron que la Hb de un paciente con anemia drepanocítica tenía una movilidad electroforética diferente a la de la Hb normal. Como el punto isoeléctrico de la Hb del paciente era más alto que el normal, Pauling pensó que posiblemente había ocurrido un cambio en la estructura primaria de esa Hb. Acuñó entonces el término de *enfermedad molecular* para referirse al hecho de que el problema radicaba en la síntesis. Luego, en 1956, Vernon Ingram, desarrolló la técnica de “*fingerprinting*” o de huellas digitales, demostrando que el problema de la anemia drepanocítica se debía a un error en el ensamblaje de la molécula de la Hb. El error consiste en que la adenina es reemplazada por timina en el codón 6 de la cadena β , lo cual conduce a que la valina, un aminoácido neutro, sustituya al ácido glutámico, un aminoácido ácido, en dicha posición de las cadenas β . Los avances realizados en este campo han permitido el descubrimiento de una gran cantidad de hemoglobinas anormales en todo el mundo, abriendo un extenso campo de investigación hematológica, conocido hoy con el nombre de **hemoglobinopatías**, cuyos aspectos fundamentales se tratan en otra sección de esta obra.

Las porfirias

Se definen las porfirias naturales como desórdenes del metabolismo de las porfirinas, de sus precursores o de

ambos. Dicho de otra manera, las porfirias humanas constituyen un grupo de desórdenes hereditarios del metabolismo, causados por aberraciones en las actividades de enzimas específicas de la vía de síntesis del grupo hem. Las porfirias son verdaderos “errores innatos del metabolismo”, pero existen también porfirias adquiridas, generalmente por exposición ocupacional (al plomo, por ejemplo) o medicamentosas (drogas porfirinogénicas). Para estas condiciones algunos autores han sugerido el nombre de *porfirinurias*.

Los pacientes con porfiria suelen desarrollar problemas en la piel como consecuencia de una excesiva sensibilidad a la luz solar o presentar un “ataque agudo” de dolor abdominal, que a menudo se acompaña de problemas neurológicos. Como en todas las porfirias, el problema básico consiste en una excesiva síntesis de porfirinas, de sus precursores o de ambos; estos pueden ser cuantificados en la orina, en las heces o en la sangre.

La introducción en la medicina humana de la sustancia llamada “sulfonal” como una droga hipnótica, ocurrió en 1888 y ya al año siguiente Barend Joseph Stokvis reportó el caso de una mujer de edad avanzada que desarrolló un cuadro caracterizado por la eliminación de orina roja, que le produjo la muerte. Este constituye el primer caso de porfiria adquirida en la historia de estos trastornos. El mismo investigador reconoció que el pigmento presente en la orina era similar, pero no idéntico, a la hematoporfirina. En 1889, Stokvis describió por primera vez la “porfiria aguda intermitente”, quizás el miembro más importante de esta familia de errores innatos del metabolismo.

Defectos enzimáticos de las porfirias

Se ha reconocido la participación de ocho enzimas en la vía metabólica que conducen al hem, y exceptuando la primera, la sintetasa (sintasa) del ácido δ -aminolevulínico, de las siete restantes se conocen estados de deficiencia que conducen a una porfiria (Cuadro N° 2).

Cuadro N° 2. Defectos enzimáticos de las porfirias			
Enzima deficiente	Clase de porfiria	Principal sitio de expresión	Modo de transmisión
δ -ALA deshidrasa	PDAD (ADP) ¹	hígado	recesiva
PBG ² desaminasa	PAI (AIP) ³	hígado	dominante
Uro-gen cosintasa	PEC (CEP) ⁴	médula ósea	recesiva
Uro-gen descarboxilasa	PCT ⁵	hígado	
	tipo I		adquirida
	tipo II		dominante
	tipo III		dominante
	PHE (HEP) ⁶	hígado y méd. ósea	recesiva
Copro-gen oxidasa	PCH (HCP) ⁷	hígado	dominante
Proto-gen oxidasa	PM (VP) ⁸	hígado	dominante
Ferroquelatasa	PPE (EPP) ⁹	médula ósea	dominante
1- porfiria por deficiencia de δ -ALA deshidrasa 2- porfobilinógeno desaminasa 3- porfiria aguda intermitente 4- porfiria eritropoyética congénita 5- porfiria cutánea tardía (corrientemente llamada tarda) 6- porfiria hepatoeritropoyética 7- coproporfiria hereditaria 8- porfiria mixta (equivocadamente llamada en español porfiria “variegata” (variegate) 9- protoporfiria eritropoyética			

Clasificación de las porfirias

Hans Günther fue el primero en clasificar las enfermedades del metabolismo de las porfirinas en dos trabajos comprensivos publicados en 1911 y en 1922. La segunda clasificación fue publicada en 1937 por Waldenström, investigador sueco que realizó una monumental contribución al estudio de estas enfermedades.

Schmid, Schwartz y Watson, en 1954, trabajando con material de autopsia, encontraron que el contenido de porfirinas del hígado de ciertos pacientes era más alto que el encontrado en otros tejidos, mientras que en otros pacientes el órgano más afectado era la médula ósea. Esto los impulsó a clasificar las porfirias en dos tipos:

1. Hepáticas.
2. Eritropoyéticas.

Más recientemente han aparecido otras clasificaciones. De estas, la que parece más útil por su sencillez es la siguiente:

1. Porfirias eritropoyéticas.

Porfiria eritropoyética congénita (PEC)
(enfermedad de Günther).
Protoporfiria eritropoyética.

2. Porfirias hepáticas.

a. Formas agudas:

Porfiria por deficiencia de deshidratasa del ácido δ -aminolevulínico.
Porfiria aguda intermitente (PAI).
Coproporfiria hereditaria (CPH).
Porfiria variada (PV).

b. Formas crónicas:

Porfiria cutánea tardía (tarda) (PCT).

3. Formas intermedias.

Porfiria eritrohepática (PEH).

Distribución geográfica y frecuencia de las porfirias

A pesar de que las porfirias son enfermedades poco frecuentes, su distribución comprende casi todas las áreas del mundo. En lo que respecta a la PAI, la más frecuente, en 1957 Waldenström sugirió para Suecia una frecuencia de 1,5 por cada 100.000 habitantes.

Para otros países como Irlanda, existen datos que sugieren una frecuencia de 1 en 80.000. En los países latinoamericanos y especialmente en los de Centroamérica, hay escasos reportes. Los dos primeros casos de porfiria en Costa Rica fueron diagnosticados por el Dr. Luis F. Rojas, uno de PAI en 1978 y otro de PE en 1983, padecimientos que se describen a continuación.

Porfiria aguda intermitente (PAI)

Es quizás la más importante de las porfirias hepáticas. Se le conoce también como *porfiria sueca* o *pirroloporfiria*. Se transmite como característica autonómica dominante, aunque su expresividad es irregular. Se presenta bajo la forma de un cuadro de abdomen agudo, que puede confundirse con algunas emergencias quirúrgicas como apendicitis o pancreatitis agudas, cólico biliar o renal, y por manifestaciones neurológicas. Desde el punto de vista bioquímico, la PAI se caracteriza por una exagerada

excreción urinaria de δ -ALA y PBG. Considerando que este último es una molécula de estructura pirrólica, se entiende el por qué a la PAI se le conoce también con el nombre de pirroloporfiria y por qué se dice a menudo que es una porfiria de precursores y no de porfirinas.

Inicialmente se reportó que el hígado de pacientes con PAI tiene una actividad aumentada de la sintasa del δ -ALA, por inducción genética. Posteriormente, se encontró otra anomalía metabólica: la reducción de la actividad de la uroporfirinógeno I sintetasa, enzima que cataliza la tercera reacción de la vía de síntesis, en las células hepáticas de los pacientes con PAI. La deficiencia de esta enzima dificulta la síntesis del grupo hem, que no progresa más allá del PBG. Esto impide el funcionamiento del mecanismo de retroalimentación negativa que ejerce el hem sobre la primera enzima de la vía, que resulta entonces inducida. Esto da lugar a una anormal producción de precursores de porfirinas, especialmente de PBG, cuya concentración elevada en la orina del paciente establece una base para formular el diagnóstico de PAI.

Porfiria eritropoyética (PE)

Existen razones para creer que el primer caso de porfiria reportado en la literatura mundial es el que describió Schultz en 1847 con el nombre de pénfigo leproso y que luego se clasificó como porfiria eritropoyética.

Se trata de una condición transmitida en forma autonómica recesiva en la que, a diferencia de PAI, predominan los síntomas dermatológicos. El paciente aquejado de PE sufre, desde la infancia, de una grave fotosensibilidad, especialmente de las áreas expuestas a la luz solar. A este problema se suman hipertriosis, eritrodoncia, esplenomegalia y anemia hemolítica, pero no se presentan síntomas neurovisceral, como ocurre en la PAI. El más problemático de los síntomas es la fotosensibilidad de la piel descubierta, que puede conducir a mutilaciones generalizadas. En las zonas afectadas se observa vello fino y oscuro, que da lugar a la "cara de lobo", como a menudo se describe esta condición.

Desde el punto de vista bioquímico, se puede decir que existe una deficiencia de uroporfirinógeno III cosintetasa en una línea de células de la médula ósea que algunos autores han denominado *serie porfioblástica*. En vista de que en estas células no se pueden formar las porfirinas de la serie isomérica III, la biosíntesis se desvía hacia las porfirinas de la serie I, que no son utilizadas para la biosíntesis del

hem. Estas moléculas se acumulan y depositan en la sangre y en los tejidos, que al ser excitados por las radiaciones solares dan lugar a reacciones de oxidación a través de la formación de radicales libres, los cuales conducen al daño tisular que caracteriza a esta variedad de porfiria. El diagnóstico de esta condición se basa en el hallazgo de cantidades excesivas de uroporfirina y coproporfirina, ambas de la serie I, en los eritrocitos y en la orina de los pacientes.

Protoporfiria eritropoyética (PPE)

Otro tipo de porfiria que cursa con fotosensibilidad, aunque no tan marcada como la que se observa en PE, es la *PPE* o protoporfiria eritrohepática, sinónimo que se le ha otorgado en vista de que los pacientes adultos a menudo desarrollan un daño hepático, de magnitud variable, caracterizado por cirrosis y colestasis. La PPE se transmite como característica autosómica dominante.

En esta variedad de porfiria el trastorno metabólico resulta en una excesiva producción de protoporfirina IX, que se acumula en los tejidos y líquidos del organismo, incluyendo los eritrocitos, el hígado, el plasma y las heces. La determinación de protoporfirina libre eritrocitaria (PPLE) permite establecer el diagnóstico.

A pesar de que se ha propuesto que el desorden metabólico primario de la PPE es una deficiencia de ferroquelatasa o sintetasa del hem, algunos estudios no han podido demostrar claramente si la enfermedad se debe a una deficiencia de esta enzima o a un exceso en la actividad de la sintasa de ácido δ -aminolevulínico.

Otras variedades de porfiria

Existen otros tipos menos frecuentes e importantes de porfirias, como la llamada "porfiria cutánea tarda" (PCT), denominada también porfiria crónica o porfiria sintomática. En este caso los pacientes pueden presentar síntomas abdominales, neurológicos y dermatológicos, que se presentan en las etapas tardías de la vida. La porfiria mixta (PM) y la coproporfiria hereditaria (CPH) presentan síntomas combinados (manifestaciones cutáneas y cuadro visceral) a temprana edad.

Diagnóstico clínico de las porfirias

Aunque las porfirias son desórdenes del metabolismo del hem poco frecuentes, el amplio ámbito y la variabilidad de sus hallazgos clínicos hacen que se les incluya en el diagnóstico diferencial de muchas enfermedades. Un resumen de los hallazgos clínicos y el modo de herencia se presenta en el Cuadro N° 3.

Cuadro N° 3. Los principales tipos de porfiria				
Porfiria	Ataques neuroviscerales agudos	Fragilidad de la piel, bulas	Fotosensibilidad aguda	Herencia
Por deficiencia de δ -ALA deshidratasa (PDALA)	+	-	-	AR*
Aguda intermitente (PAI)	+			AD**
Eritropoyética congénita (PE)	-	+	-	AR
Cutánea tardía (PCT)	-	+		AD***
Coproporfiria hereditaria (CPH)	+	+		AD
Porfiria mixta (variegata) (PM)	+	+		AD
Protoporfiria eritropoyética (PPE)	-	-	+	AD

* autosómica recesiva.

** autosómica dominante.

*** 15-20% autosómica dominante.

Presentación con síntomas neuroviscerales (porfiria aguda)

Esta sintomatología es propia de cuatro tipos de

porfiria: la extremadamente rara PDALA, PAI, CPH y PM. Los ataques neuroviscerales de estas porfirias se acompañan de una excesiva excreción urinaria de PBG y, en menor grado, de δ -ALA, con excepción de

la primera de las mencionadas, en la cual la excreción de PBG es normal.

Lo anterior permite decir que el examen de la orina para detectar exceso de PBG es clave en la investigación de los pacientes sospechosos de estas porfirias. Por otro lado, también se puede decir que la determinación de las porfirinas urinarias totales no presta ninguna ayuda y más bien puede inducir a confusión.

Presentación con síntomas dermatológicos (porfiria cutánea)

Las lesiones cutáneas son causadas por fotosensibilización de la piel por las porfirinas, las cuales siempre se presentan con una sobreproducción. Este tipo de sintomatología se manifiesta en la PPE, la PE y la PCT. Los pacientes con PPE usualmente presentan fotosensibilidad aguda en la niñez, aunque esta no se acompaña de fragilidad de la piel o bulas. Las otras formas de porfiria cutánea (porfiria bulosa) presentan fragilidad de la piel, bulas y otras lesiones en las zonas expuestas al sol.

Un caso sospechoso de PPE se puede confirmar o excluir por medición de PPLE, siempre y cuando se utilice un método que permita diferenciar entre protoporfirina libre y protoporfirina ligada al zinc. Para los casos sospechosos de PCT se requiere un examen de orina y de heces o de plasma, en busca de exceso de porfirinas. El de plasma es un sustituto adecuado del de heces y es particularmente importante para diferenciar a la PM de las otras formas de porfiria bulosa, de las cuales la PCT es, sin lugar a dudas, la más corriente.

EL PAPEL BIOLÓGICO DE LA HEMOGLOBINA

La hemoglobina y la respiración

La respiración se puede estudiar desde diversos puntos de vista. En este caso, se entiende por respiración al intercambio de dos gases (el O_2 y el CO_2) entre el organismo y el ambiente en que este vive. El O_2 hace posible las tareas oxidativas del metabolismo: se refiere entonces al metabolismo aeróbico. En cambio, el CO_2 constituye un residuo de los procesos oxidativos; de hecho, la forma más oxidada del átomo de carbono, por lo que se considera como un desecho del metabolismo.

El intercambio gaseoso se realiza gracias al transporte de O_2 de los pulmones a los tejidos, tarea que la naturaleza encomendó a los glóbulos rojos (eritrocitos) presentes en la fracción celular de la sangre. A su paso por los alvéolos pulmonares, el

pigmento respiratorio presente en ellos, la Hb, se combina con el O_2 a través de la parte prostética del átomo de hierro (Fe^{+2}) y forma un derivado, el cual se conoce como *oxihemoglobina* o Hb oxigenada (HbO_2). Este derivado, entonces, se encuentra en gran concentración en la sangre arterial, que abandona el ambiente pulmonar prácticamente 100% saturada de O_2 . Por una vía inversa, la Hb propicia el transporte del CO_2 de los tejidos a los pulmones, pero en este caso bajo la forma de protones (H^+). Estos tienen su origen intraeritrocíticamente cuando el CO_2 reacciona con el H_2O , para producir HCO_3^- y H^+ en una reacción catalizada por la enzima *anhidrasa carbónica*. Los H^+ “debilitan” el enlace que une al O_2 con el Fe de la Hb. Al desprenderse el O_2 para pasar a la célula tisular, aparece la forma desoxigenada de la Hb o DesHb. Una pequeña parte del CO_2 producido por las células se une directamente a la Hb y forma la *carbaminohemoglobina*, un carbaminoderivado de la proteína.

En los organismos simples, el intercambio gaseoso se realiza por un sencillo mecanismo de difusión de los gases a través de las membranas. En los animales superiores, como el hombre, el fenómeno es mucho más complicado, en parte debido a la gran demanda de O_2 que requiere el organismo humano para mantener la velocidad de su rápido metabolismo, característico de los animales de sangre caliente. Se ha calculado que el ser humano consume cerca de 500 litros de O_2 por día y que produce un volumen más o menos parecido de CO_2 .

CAPACIDAD DE LA SANGRE PARA TRANSPORTAR GASES

El transporte del oxígeno

1. Capacidad de O_2 del plasma comparada con la de la sangre total. El plasma sanguíneo, por ser una solución acuosa compleja, constituye un mal disolvente de gases. En lo que respecta al O_2 , su solubilidad expresada como *coeficiente de Bunsen* es igual a 0,024 ml, lo que significa que 1 ml de plasma disuelve 0,024 ml de O_2 cuando la presión del gas sobre el líquido es igual a 1 atmósfera (760 mm de mercurio). Tomando en cuenta que la presión parcial del O_2 en los alvéolos pulmonares es aproximadamente igual a 100 mm, 100 ml de plasma pueden disolver unos 0,3 ml de O_2 . Se dice entonces que la capacidad de O_2 del plasma es igual a 0,3 volúmenes por ciento (0,3 vols%).

Cada glóbulo rojo presente en nuestra sangre constituye una solución concentrada de Hb. Globalmente, la sangre tiene cerca de 15 g/dl de

Hb. A su vez, esta tiene 0,34% de Fe. Cada átomo o molécula de Fe (que es monoatómica) presente en el grupo hem transporta una molécula de O_2 . Se dice entonces que cada mol de Fe transporta 1 mol de O_2 . Siguiendo con esta línea de pensamiento, los 15 g de Hb que hay en 100 ml de sangre representan 0,00089 moles de Fe, es decir, 0,00089 moles de O_2 (g/PM). Suponiendo que se hace este tratamiento en condiciones estándar de temperatura y presión, cada mol de O_2 ocupa un volumen de 22,4 L (volumen molar de los gases). De esa forma, se llega a la conclusión de que los 0,00089 moles de O_2 constituyen un volumen de 0,0199 L, es decir 19,9 ml. Esto permite afirmar que 100 ml de sangre transportan unos 20 ml de O_2 ; dicho en otras palabras, que la capacidad de O_2 de la sangre es de 20 vols% (20 ml/100 ml). La capacidad de O_2 de la sangre es, de acuerdo con esto, unas 60 veces mayor que la del plasma, diferencia que se debe a la Hb presente en la sangre.

2. La curva de disociación de la Hb. La llamada curva de disociación de la Hb constituye una representación gráfica de lo que ocurre cuando se relaciona el porcentaje de saturación de la Hb y la presión parcial del O_2 (Figura N° 8).

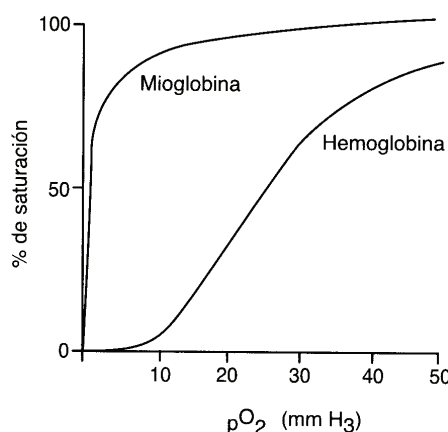
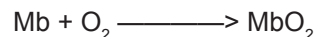


Figura N° 8. Curvas de disociación de la hemoglobina y de la mioglobina.

Como puede observarse, la curva correspondiente a la mioglobina tiene forma hiperbólica regular y en cambio la de la Hb tiene forma sigmoidea (semeja una S estirada). A continuación se enumeran algunos comentarios en torno a estos hallazgos:

1. La Mb es una proteína de cadena única, es decir, consiste en una estructura primaria compuesta

por 153 residuos de aminoácidos, con un grupo Heme y un peso molecular cercano a los 17 kD. La forma de su curva de saturación con O_2 indica una relación simple que se puede representar de la siguiente forma:



Esto significa que la capacidad para enlazar o capturar O_2 depende básicamente de las concentraciones de ambos reactantes, la proteína y el O_2 , en el medio en donde se lleva a cabo la reacción. Así lo explica la Ley de Acción de las Masas (Guldberg y Waage), que permite establecer una constante de equilibrio para esa reacción. Esto se puede expresar de la siguiente manera:

$$K = \frac{[MbO_2]}{[Mb] [O_2]}$$

2. A diferencia de lo que ocurre con la Mb, la curva de disociación de la Hb adquiere una forma sigmoide, cuya constante de equilibrio es un poco más compleja:

$$K = \frac{[HbO_2]}{[Hb] [O_2]^n}$$

Bohr, en 1904, describió por primera vez la relación sigmoide, permitiendo que Hill, más tarde, postulara que en la Hb existen varios lugares de unión para el O_2 , para luego derivar una relación empírica, que se presenta en esta forma:

$$\frac{pO_2}{P_{50}} = \frac{\% \text{ sat.}}{100 - \% \text{ sat.}}$$

En esta igualdad, P_{50} es la presión parcial de O_2 , en mm de Hg, en la cual el 50% de los sitios de unión están saturados. En un ámbito de saturación de 15 a 95%, la curva sigmoidea puede ser descrita por el coeficiente de Hill, igual a 2,7 (2,4 - 2,9), que representa a la pendiente de la curva.

A diferencia de la Mb, la Hb es una proteína tetramérica, formada por dos cadenas α y dos β , cada una de ellas con un grupo prostético, que a su vez tiene un átomo de Fe^{+2} . Esto nos indica que la Hb tiene cuatro grupos prostéticos enlazadores de O_2 .

En vista de que el coeficiente de Hill (n) no es 1, sino 2,7, se sugiere que la unión de la molécula de O_2 con cada uno de los cuatro Fe de los grupos

hem no es independiente de los otros tres, sino que la facilidad de unión del O_2 con cada uno depende del estado de oxigenación de los otros tres. Así, el primer O_2 se enlaza con relativa lentitud, el segundo con más rapidez y el cuarto mucho más rápidamente que el primero. A esto se le llama *cooperativismo* o *efecto cooperativo*.

El valor de la P_{50} se puede determinar midiendo la saturación de una muestra de sangre equilibrada con diferentes presiones parciales de O_2 , corrigiéndola para las condiciones estándar de pH fisiológico (7,4), para la temperatura corporal igual a 37 °C y una pCO_2 de 40 mm/Hg, que es la presión parcial de referencia en la sangre arterial. En la curva trazada, la P_{50} tiene un valor de 26,3 mm/Hg en los adultos, dato que resulta muy útil pues ilustra la afinidad de la Hb por el O_2 , pudiendo ser comparada con la que poseen las hemoglobinas anormales o con la de pacientes con diferentes cuadros patológicos.

El transporte del bióxido de carbono

1. Físicamente disuelto

Se llama *coeficiente de Bunsen* al volumen de gas que puede disolver físicamente 1 ml de líquido, cuando la presión parcial del gas sobre el líquido es igual a 1 atmósfera (760 mm/Hg). El coeficiente de

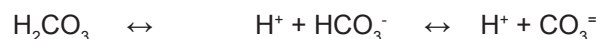
Bunsen del CO_2 en el plasma sanguíneo es de 0,51 ml y aunque es mayor que el del O_2 (0,024), todavía es muy pequeño como para que la solubilidad física sea una forma efectiva de transporte sanguíneo de CO_2 . Por otra parte, no se debe olvidar que la presión parcial de este gas siempre es menor que la del O_2 .

2. "Químicamente" combinado

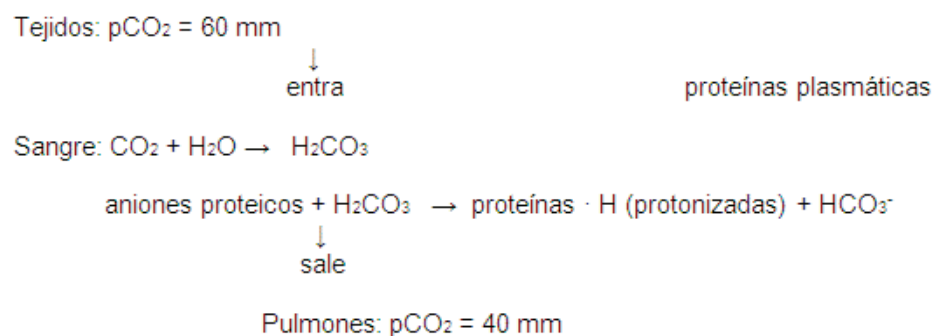
a) Formación de bicarbonato en el plasma.

El CO_2 que entra a la sangre proveniente de los tejidos se transforma pobremente en ácido carbónico (H_2CO_3), al reaccionar con el agua plasmática (recuerde que en el plasma no está presente la anhidrasa carbónica, la enzima eritrocítica que cataliza esta reacción).

De acuerdo con los principios del equilibrio químico, el ácido se disocia de la siguiente manera:



Reacción reversible, cuya primera etapa posee una pK de 6,1. Los H^+ que se liberan son capturados por los aniones de las proteínas plasmáticas, que cuentan con un punto isoeléctrico más bajo que el pH del plasma y por eso tienen carga negativa, es decir, son aniones. El resultado de la reacción es la formación de iones HCO_3^- , de acuerdo con el siguiente esquema simple:



Las proteínas actúan como un sistema regulador del pH, pues una proteína protonizada es un ácido más débil que el H_2CO_3 . Además, actúan prácticamente como la base conjugada del sistema. Aunque el sistema regulador formado por los iones fosfato $HPO_4^{2-}/H_2PO_4^-$ también es capaz de formar algo de bicarbonato en el ambiente extracelular, desde el punto de vista cuantitativo tiene poca importancia. Las interacciones citadas ocurren hacia la derecha cuando la sangre circula por los tejidos y se invierten cuando la sangre llega a los pulmones.

b) Formación de bicarbonato en el eritrocito. El transporte isohídrico.

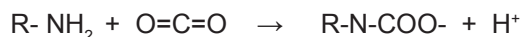
En este proceso participan dos proteínas intracelulares: la Hb y una enzima que ya se ha mencionado antes: la *anhidrasa carbónica* (AC). El papel que desempeñan estas dos proteínas es fundamental para la vida. La AC, una de las enzimas más activas que se conocen, acelera la reacción de hidratación del CO_2 unas 10^7 veces. De este modo, la formación de H_2CO_3 y su disociación, de acuerdo con la Ley del Equilibrio Químico, da lugar a una gran cantidad de H^+ y de HCO_3^- . Esta reacción ocurre en el ambiente tisular,

donde el metabolismo se encarga de generar el CO_2 . Los H^+ que se forman no representan ningún peligro para la homeostasia celular y más bien son una necesidad, porque su formación permite que el O_2 , presente bajo la forma de HbO_2 , se desprenda y pase al ambiente tisular, que es donde justamente se necesita. Esos H^+ (protones de Bohr) son los responsables de la pérdida de afinidad de la Hb por el O_2 .

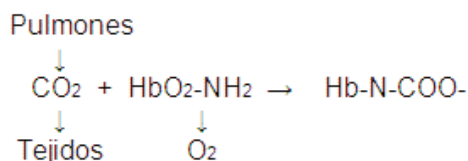
Al llegar a los pulmones la DesHb libera los H^+ que había recogido en el ambiente tisular, a medida que los átomos de O_2 se pegan al Fe de su grupo prostético. Los H^+ libres se combinan de nuevo con el HCO_3^- para formar H_2CO_3 , que la AC se encarga de transformar en $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$.

c) Formación de carbaminohemoglobina.

Se tiene conocimiento que existen muchas sustancias con grupos amino libres en sus moléculas, que poseen la capacidad de reaccionar con el CO_2 para formar carbaminoderivados inestables, de acuerdo con la siguiente ecuación:



Entre las sustancias capaces de ejecutar estas reacciones se pueden mencionar las aminas alifáticas, los AAs e incluso al amoníaco. Como la reacción es reversible, un aumento de la $p\text{CO}_2$ incrementa la velocidad de formación de los carbaminoderivados y viceversa. La Hb tiene grupos amino libres que pueden reaccionar con CO_2 para formar *carbaminohemoglobina*. Esta reacción ocurre más fácilmente con DesHb, lo que quiere decir que la oxigenación de la Hb que está como carbaminoderivado hace que este se descomponga y libere el gas. Lo inverso ocurre en los tejidos, y ambas reacciones se pueden representar de la siguiente manera:



Relaciones entre la estructura y la función

La principal Hb de la sangre del ser humano adulto consta, como ya se mencionó, de dos cadenas α y dos β . El arreglo de estas cuatro cadenas determina la estructura cuaternaria de la Hb.

Las unidades monoméricas de la DesHb se mantienen unidas por enlaces electrostáticos en una forma que se llama *conformación tensa* o T, dotada de una afinidad relativamente baja por el O_2 . La unión con este gas genera cambios químicos y físicos que producen estrés y rompen esos enlaces electrostáticos, conduciendo a la *conformación relajada* o R, en la cual los sitios de unión quedan más expuestos y le confieren a la molécula una afinidad 500 veces mayor por el O_2 que la que tenía en la conformación tensa.

Los cambios conformacionales conducen al efecto cooperativo entre los sitios de oxigenación, de modo que la unión de un O_2 a uno de ellos aumenta la afinidad por el O_2 de los otros. Así, la forma sigmoidea de la curva de saturación refleja la transición entre un estado de baja afinidad a otro de alta, a medida que los sitios se van saturando. Desde un punto de vista fisiológico, esto es muy importante. Cuando la sangre fluye por los pulmones donde la presión parcial del O_2 es alta, la Hb alcanza un alto grado de saturación, cercano al 100%. Cuando llega a los tejidos donde la presión es baja, la forma de la curva indica que la Hb libera el O_2 justamente donde el gas es más necesario. Por el contrario, la forma hiperbólica de la curva de saturación de la Mb indica que a cualquier presión de O_2 esta proteína se encuentra más saturada que la Hb, es decir, tiene más afinidad por el gas. Observe la curva y note que la P_{50} de la Mb tiene un valor cercano a 1. Surge entonces esta pregunta: ¿qué clase de oxigenación puede facilitar esta proteína si, por decirlo así, no suelta el O_2 aún en los ambientes pobres en este gas?

El comportamiento de la Hb ilustra la forma en que una enzima alostérica regula una vía metabólica. Las propiedades que posee una proteína alostérica son:

1. La proteína tiene varios sitios de unión o dominios: en la Hb, los cuatro grupos hem, cada uno con un átomo de Fe enlazador de O_2 .
2. Se une en forma no covalente y reversible a un ligando primario: en la Hb, el O_2 .
3. Experimenta cambios conformacionales cuaternarios inducidos por la unión a un ligando, lo que se conoce como *efecto homotrópico*. En la Hb los estados R y T.
4. Su efecto es modulado por la unión de un ligando-efecto secundario, fenómeno que se designa con el nombre de *efecto heterotrópico*. En la Hb, los efectores heterotrópicos mayores son los iones hidrógeno (H^+), el CO_2 y el ácido 2,3-difosfoglicérico (2,3DPG).

Los protones, el oxígeno y el bióxido de carbono

La adición de H^+ o CO_2 a la sangre reduce la habilidad de la Hb para unirse al O_2 . A esto se le conoce como *efecto de Bohr*. Inversamente, la oxigenación de la molécula reduce su afinidad por el CO_2 y esto constituye el *efecto de Haldane* (Figura N° 9).

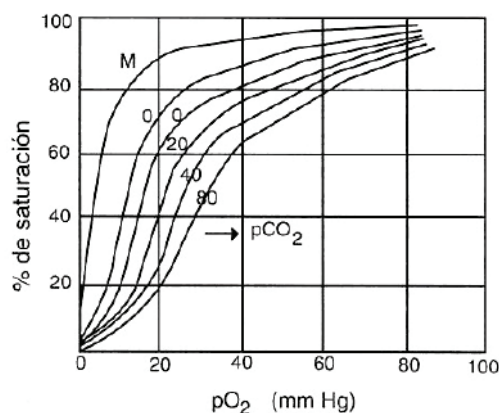


Figura N° 9. La curva de disociación y el efecto de Bohr.

En los capilares tisulares, el CO_2 difunde hacia el interior de los eritrocitos y se une a los grupos NH_2 terminales de las cadenas α y β , lo que da lugar a la formación del derivado *carbaminohemoglobina*. El CO_2 también se combina con el H_2O gracias a la participación de la AC, como ya se mencionó. El ácido se disocia en H^+ y HCO_3^- . Los primeros se ligan a residuos de AAs específicos para estabilizar la conformación T y facilitar de paso la liberación del O_2 (efecto de Bohr del CO_2). La DesHb que se forma estimula la captura del CO_2 , favoreciendo la formación de carbaminohemoglobina. Lo inverso ocurre en los capilares pulmonares, donde existe un ambiente de baja pCO_2 y alta pO_2 .

La protonización de la desHb es lo que permite que el O_2 se "suelte" de la Hb. Vale la pena insistir que ni HbO_2 ni desHb son reducidas u oxidadas, puesto que la valencia del Fe en ambas siempre es +2. La Hb oxidadada es la forma que tiene el Fe con valencia +3; esta es la Metahemoglobina (MetaHb) y no puede transportar el O_2 .

La Mb no experimenta ningún cambio en lo que respecta a su afinidad por el O_2 en un ámbito muy amplio de valores de pH. Tampoco el CO_2 ejerce sobre ella un efecto apreciable. En la Hb, en cambio, la acidez aumenta la liberación del O_2 .

Como se indicó anteriormente, el efecto de Bohr se refiere al cambio de afinidad por el O_2 que experimenta

la Hb debido a los cambios en la presión parcial del CO_2 . Si la presión parcial de este gas aumenta, disminuye entonces la afinidad de la Hb por el O_2 y la curva de saturación que ilustra el proceso se desplaza hacia la derecha.

El efecto de Bohr es el resultado de las diferencias estructurales entre la HbO_2 y la DesHb, y en él juegan un papel muy importante el residuo de histidina β -146 y el de valina α -1. El primero forma puentes salinos en la Hb, pero no en la HbO_2 ; además, tiene un pK_3 igual a 8 en la Hb, que cambia a 7,1 en la HbO_2 . Entonces, a pH 7,4 la histidina β -146 tiene más afinidad por los H^+ en la Hb que en la HbO_2 . En consecuencia, este residuo es el responsable de la mayor parte del efecto de Bohr. La valina α -1 que también forma puentes salinos en la Hb, es responsable del 20% de este efecto. El pK del grupo amino de este residuo es cerca de media unidad de pH más alto en la Hb que en la HbO_2 , lo cual hace que a pH 7,4 estos grupos acepten más H^+ en la Hb que en la HbO_2 .

¿Cómo actúa la histidina? En la HbO_2 la his β -146 puede rotar libremente, mientras que en la Hb este residuo terminal participa en cierto número de interacciones. Una importante es la que realiza con el residuo de ácido aspártico β -94. La proximidad de este aminoácido ácido aumenta las posibilidades de que el grupo imidazol de la histidina capture un protón; en otras palabras, el residuo de ácido aspártico sube el valor de la pK del grupo imidazol de la histidina. Entonces, en el paso de HbO_2 a Hb, la his β -146 adquiere más afinidad por los H^+ , debido a que la carga del ambiente se altera.

El ácido 2,3-difosfoglicérico

La Hb presente en los eritrocitos tiene menor afinidad por el O_2 que la que tiene la proteína libre disuelta en agua. En 1921, Barcroft se había preguntado si no habría una tercera sustancia que formara parte del complejo $Hb-O_2$. Benesch y Benesch, en 1967, demostraron que el ácido 2,3-difosfoglicérico (2,3-DPG) se une a la molécula de Hb y ejerce un importante efecto sobre su afinidad por el O_2 . Tiempo después, se encontró que la concentración de este metabolito en el ambiente intraeritrocitario es 4,5 mM, aproximadamente igual a la de la Hb.

El metabolismo del glóbulo rojo descansa en la glicólisis, de la cual el 2,3-DPG es un derivado normal. Durante este proceso metabólico el ácido 1,3-difosfoglicérico se produce por la acción de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa sobre el gliceraldehido-3-fosfato. En el paso siguiente el ácido 1,3-difosfoglicérico se hidroliza y con la energía que

se libera de su enlace de elevada energía, permite la síntesis de una molécula de ATP a partir de ADP y de fosfato inorgánico. Si esta reacción no se realiza, el

ácido 1,3-difosfoglicérico se puede convertir en 2,3-DPG por la acción de la enzima llamada mutasa de ácido 1,3-difosfoglicérico (Figura N° 10).

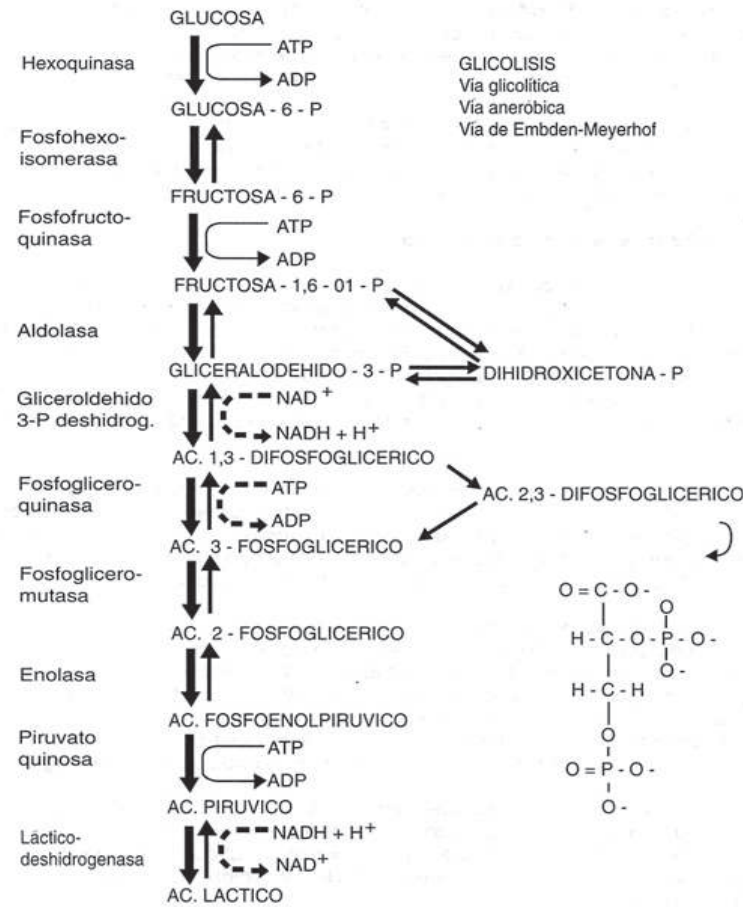


Figura N° 10. Vía glicolítica.

En la mayoría de las células la concentración de 2,3-DPG es baja, porque se ejerce una potente inhibición por retroalimentación sobre la mutasa o sobre la deshidrogenasa del gliceroldehido-3-P. En los eritrocitos, en cambio, este metabolito es secuestrado por la DesHb y, como consecuencia, no se efectúa la retroinhibición antes mencionada. Esto hace que su producción aumente. El 2,3-DPG, una molécula que tiene cinco cargas negativas, se une a un sitio cargado positivamente que se ubica en las cadenas β de la Hb, ayudando así a estabilizar la conformación T, lo cual reduce la afinidad de la Hb por el O_2 .

El valor de la P_{50} aumenta a medida que se incrementa la concentración de 2,3-DPG, la cual, a su vez, aumenta cuando la disponibilidad de O_2 disminuye, como ocurre en la hipoxia o en la anemia. La concentración de 2,3-DPG disminuye al aumentar la edad de los glóbulos rojos o en condiciones de

hiperoxia o de inhibición de la glicólisis (por acidosis o por hipofosfatemia). En ausencia de 2,3-DPG, la P_{50} de la Hb es aproximadamente igual a la de la Mb, esto es, cerca de 1 mm/Hg. En su presencia este valor sube hasta 26 mm/Hg.

¿En qué sitio de la molécula de Hb se une el 2,3-DPG?

En vista de que la molécula de 2,3-DPG es de características ácidas y el pH fisiológico tiene cinco cargas negativas, es de esperar que establezca nexos con cinco grupos de carga positiva. ¿Cuáles grupos se prestan a esta relación? Los siguientes residuos, todos de las cadenas β :

- El grupo amino terminal: NA 1 (residuo N°1, valina).
- El residuo EF 6 (residuo N° 82, lisina).

- c. El residuo H 21 (residuo N° 143 y el NA 2 residuo N° 2, que corresponden a la histidina).

La relación estequiométrica de la reacción es tal que una molécula de 2,3-DPG se une a una del tetrámero de Hb. La unión con el 2,3-DPG estabiliza a la DesHb, pero tiene poco efecto sobre la estructura terciaria de cada cadena. Esto quiere decir que el 2,3-DPG es un estabilizador de la estructura cuaternaria de la DesHb.

El efecto combinado de los enlaces salinos, los contactos entre subunidades y la unión al 2,3-DPG, mantienen los grupos hem en un estado de baja afinidad por el O_2 . En el estado de desoxigenación o de baja afinidad (T) los átomos de Fe de los grupos hem están fuera del anillo porfirínico y los "nichos" del hem son un poco más pequeños que en la HbO_2 . Cuando un O_2 se une al primer Fe de una subunidad, la estructura terciaria de esta cambia: la cavidad central que aloja al 2,3-DPG se hace más pequeña, pues se establecen puentes salinos que acercan las cadenas. Los cambios se propagan hasta otras subunidades, de modo que entre más O_2 se une, más fácilmente se despega el 2,3-DPG, se establecen los enlaces entre las subunidades y los grupos hem aumentan su afinidad por el O_2 , como resultado de los cambios en las conformaciones de los sitios del hem. La HbO_2 formada adopta entonces una estructura más relajada (estado R), que tiene más afinidad por el O_2 .

¿Qué sucede en otras hemoglobinas cuyas respuestas al 2,3-DPG son menos marcadas?

- a) Un ejemplo de ello lo constituye la HbF, a la cual se une débilmente el 2,3-DPG, debido a que el residuo H21, que en la HbA es histidina, en la HbF ha sido sustituido por serina. La histidina tiene una carga positiva a pH fisiológico, de modo que al desaparecer esta, disminuye la afinidad por el 2,3-DPG, pero aumenta la afinidad por el O_2 .
- b) En los rumiantes, las cadenas beta tienen solo 145 residuos, por lo que Perutz propuso que la distancia entre las cadenas es muy grande como para que la DesHb se combine con el 2,3-DPG.

La importancia del 2,3-DPG como regulador del transporte del O_2 por la Hb, se pone de manifiesto con los cambios de la P_{50} que ocurren en la sangre almacenada en un medio convencional, como el formado por ácido citrato dextrosa. En esas condiciones, la afinidad de la Hb por el O_2 aumenta, de manera que la P_{50} es menor de 26 mm. Este cambio se debe a que, con el tiempo, la concentración de 2,3-DPG disminuye, pues de 4,5 mM puede pasar a 0,5

mM en unos 10 días. Una sangre en esas condiciones no ayuda mucho a un paciente cuyos tejidos necesitan O_2 con urgencia, pues su entrega es disminuida, debido a la imposibilidad de que el O_2 se desprenda de la Hb por falta de 2,3-DPG. Los glóbulos rojos desprovistos de 2,3-DPG pueden sintetizar hasta el 50% de la concentración normal de este metabolito, unas 24 horas después de haber sido transfundidos a un paciente. Sin embargo, esta recuperación puede no ocurrir en forma rápida en una persona gravemente enferma. Por otra parte, la concentración de 2,3-DPG de los eritrocitos deficientes no mejora añadiéndole el ácido a la sangre, ya que la membrana del eritrocito no es permeable a él por tratarse de una molécula tan negativamente cargada. Sin embargo, el descenso de la concentración de 2,3-DPG en los eritrocitos puede impedirse si a la sangre se le añade inosina.

Influencia de la temperatura

A medida que la temperatura corporal aumenta, la afinidad de la Hb por el O_2 disminuye, subiendo la P_{50} y estimulándose la liberación del O_2 . Este fenómeno es especialmente importante en el ejercicio prologando y pesado.

Debido a que en el laboratorio clínico la presión parcial o tensión del O_2 se mide a 37 °C y no exactamente a un valor igual a la temperatura corporal, la determinación puede prestarse a errores, de modo que la tensión puede ser subestimada en pacientes con hipertermia o sobreestimada en casos de hipotermia. Así, en un paciente febril, en el cual la temperatura corporal es de 41 °C, con una tensión de O_2 de 60 mm/Hg (medida a 37 °C), la tensión verdadera *in vivo* es 20% más alta, es decir, unos 72 mm/Hg. La misma determinación en un paciente con hipotermia (una temperatura corporal de 33 °C, por ejemplo) corresponde aproximadamente a 48 mm/Hg. De igual manera, la tensión del CO_2 puede ser subestimada en la hipertermia o sobreestimada en pacientes con hipotermia. Deben hacerse entonces las correcciones del caso.

La unión con el óxido nítrico

La Hb se une al óxido nítrico (NO) a través de sitios de gran afinidad por este gas que tienen los grupos hem, cuando el Fe se encuentra con valencia +2 (ferroso). Se dice que la afinidad por el NO es 8000 veces mayor que la que tiene por el O_2 .

Recientemente se ha encontrado un sitio de unión en el residuo β -93, un residuo de cisteína, en el cual se pega el NO bajo la forma de S-nitrosotiol (debe recordarse que la cisteína es un aminoácido sulfurado: el ácido α -amino- β -tiopropiónico o α -amino

β -mercaptopropiónico). A medida que la Hb liga O_2 en los pulmones, su afinidad para ligar NO aumenta. A medida que el O_2 es entregado a los tejidos, su habilidad para formar el S-nitrosotiol derivado disminuye y entonces el NO es liberado hacia los tejidos. De modo que, además de transportar O_2 , la molécula de Hb transporta NO. La liberación de este gas a partir de la nitrosohemoglobina en los tejidos hipóxicos reduce la resistencia vascular regional, debido a efecto vasodilatador del NO.

Importancia clínica de la función de la hemoglobina

La P_{50} óptima

Las velocidades de oxigenación de la sangre en los pulmones y de desoxigenación en los capilares de los tejidos son determinadas por las gradientes de presión respectivas, que permiten la difusión en los pulmones ($pO_2 \text{ alv} - P_{50}$) y en los tejidos ($P_{50} - pO_2 \text{ mit}$).

Para cualquier combinación de gasto cardíaco máximo, presión parcial de O_2 en los alvéolos y capacidad de difusión de los pulmones y de los tejidos, existe una P_{50} óptima que permite cargas y descargas máximas del O_2 . Así, por ejemplo, una P_{50} baja aumenta la capacidad de O_2 de la Hb y una P_{50} alta incrementa la descarga del O_2 en los capilares periféricos.

El ajuste por retroalimentación es realizado principalmente por el control alostérico de la P_{50} a través del efecto de Bohr y de la temperatura, así como también por el control quimiorreceptor de la ventilación. Cuando la P_{50} es muy alta, la oxigenación de la Hb es disminuida y entonces baja la presión parcial del O_2 en la sangre arterial. La hipoxemia estimula entonces la ventilación, lo cual aumenta la tensión del gas en los alvéolos y el pH sanguíneo, bajando la P_{50} . Por el contrario, si la P_{50} es muy baja, es decir, si la afinidad de la Hb por el O_2 sube, la descarga del O_2 es más difícil, por lo que al producirse una acidosis tisular, P_{50} sube hasta los valores normales.

Adaptación a las altitudes

En los lugares muy elevados sobre el nivel del mar, la limitación primaria para el transporte de O_2 consiste en la dificultad para "cargar" la Hb con el gas, debido a la hipoxia alveolar. El ajuste deseable ha de ser, entonces, el desarrollo de una P_{50} más baja, es decir, un aumento en la afinidad de la Hb por el O_2 . La idea es hacer más grande la diferencia entre la tensión alveolar y la P_{50} . Sin embargo, a altitudes moderadamente altas (3100 m sobre el nivel del mar), la hipoxia induce un aumento del 2,3-DPG en los glóbulos rojos que eleva el valor de la P_{50} hasta

aproximadamente 29 mm/Hg. Un ejercicio pesado a 3100 m induce un aumento posterior de la P_{50} hasta unos 38 mm/Hg.

Este aumento, aparentemente paradójico, puede ser beneficioso en el reposo o en el ejercicio moderado, en tanto la oxigenación pueda ser mantenida por aumento de la tensión de O_2 en los alvéolos, a través de un estímulo ventilatorio. En condiciones de hipoxia grave o en lugares extremadamente altos, la hiperventilación no puede aumentar de manera adecuada la oxigenación alveolar, pero la alcalosis respiratoria asociada causa un gran descenso de la P_{50} .

Los alpinistas de élite, respirando aire ambiental en la cumbre del Monte Everest, a una elevación de 8800 m y una pO_2 en el aire inspirado de 43 mm/Hg, tienen una pO_2 alveolar de 35 mm y una pO_2 arterial de 28 mm/Hg. En un ambiente cercano al nivel del mar estos valores serían de 158 y 101 mm, respectivamente. La saturación que ocurre en el Everest, igual a 55%, sería incompatible con el estado consciente de la persona. Pero el profundo estímulo hipóxico ventilatorio da lugar a una marcada alcalosis (pH arterial mayor de 7,7 y una pCO_2 de 7,5 mm), lo que sumado a una reducción de la P_{50} hasta 20 mm/Hg, eleva la saturación arterial de O_2 hasta 78%. De esta manera, la fuerte hipoxia y el control por retroalimentación de los mecanismos de combinación de la Hb O_2 permiten a los escaladores efectuar una adecuada saturación para sobrevivir por cortos períodos, sin la necesidad de O_2 adicional.

Existe una fuerte correlación inversa entre la P_{50} y la concentración de Hb. Los pacientes que tienen variedades de Hbs con alta afinidad por el O_2 , generalmente son asintomáticos, pero a menudo tienen eritrocitosis secundaria, una indicación de que el aumento de la afinidad por el O_2 causa un déficit de O_2 importante, aún a nivel del mar.

Por otra parte, la alta afinidad por el O_2 tiene una ventaja potencial en la aclimatación a las grandes alturas. Pacientes con Hb Andrew-Minneapolis, cuya P_{50} es de 17 mm/Hg, mantienen una saturación arterial de O_2 normal a una altitud de 3100 m. Comparados con sujetos sanos, con Hb normal, no muestran deterioro en la captura máxima de O_2 , tienen un pequeño aumento en la frecuencia cardíaca y no experimentan incremento de la concentración de eritropoyetina en altas elevaciones. Se les denomina "llamas humanas". El nombre hace referencia a animales adaptados a grandes altitudes como los yaks, las llamas y las alpacas, así como también los gansos, que emigran sobre los Andes o los Himalayas. Todos ellos tienen Hbs de alta afinidad por el O_2 , con valores de P_{50} 10

mm/Hg más bajos que los que corresponden a las especies aclimatadas a bajas alturas. Esto se lleva a cabo por sustituciones de ciertos residuos de AAs en las estructuras primarias de estas Hbs, unidas a persistencia de la hemoglobina fetal (PHHbF).

Este tema es controversial cuando se aplica a los seres humanos. Reportes iniciales indicaron que los nativos de los Andes tenían una Hb de más afinidad por el O_2 y un mayor efecto de Bohr, sin embargo, esto no fue confirmado por estudios posteriores. Los indígenas serpas de los Himalayas presentan menos hipoxia y una gradiente más baja de tensión alveolar-tensión arterial de O_2 que los habitantes de tierras bajas aclimatados, lo cual descarta que tengan una Hb diferente. La enfermedad de las alturas es prácticamente desconocida entre los serpas, pero está bien documentada entre los nativos peruanos. Los mecanismos permanecen desconocidos.

Anemia de las células falciformes

La sustitución de un residuo de ácido glutámico por uno de valina en la posición 6 de las cadenas β de la Hb, da lugar a la síntesis de una variedad de Hb, conocida como HbS. Los glóbulos rojos de la sangre de estos pacientes transportan, entonces, una Hb mutada, cuyo punto isoeléctrico es anormal, debido al cambio o sustitución de un AA ácido por otro neutro. La presencia de la HbS se convierte en la causa de una entidad patológica conocida como *drepanocitemia*. La Hb mutada tiene una afinidad normal por el O_2 cuando se encuentra disuelta en agua. Sin embargo, la sangre de estos pacientes tiene una afinidad disminuida por el O_2 , como resultado de la polimerización intracelular de la Hb mutada, ya que aumenta la concentración de 2,3-DPG.

El efecto de Bohr también se incrementa en la sangre de estos pacientes y un descenso dado del pH tisular causa una disminución más grande en la afinidad por el O_2 , dado que los H^+ “debilitan” el enlace del O_2 con el Fe del grupo hem. Por otro lado, la P_{50} aumentada facilita la descarga del O_2 y explica por qué los pacientes pueden tolerar bastante bien una anemia grave crónica. No se debe olvidar, sin embargo, que una P_{50} más alta favorece la formación de la DesHb, la cual, a su vez, aumenta la polimerización de la HbS y puede disparar una crisis si el pH periférico baja.

Efecto del monóxido de carbono

Debido a que la afinidad de la Hb por el CO es 200 veces mayor que la que tiene por el O_2 , la proteína tiende a combinarse con él en vez de hacerlo con el O_2 durante el tránsito pulmonar. Esto explica el hallazgo

de que una cantidad pequeña de CO puede ser letal si se inspira por largo tiempo.

Los efectos de la carboxihemoglobina (HbCO), que es el nombre del derivado que se forma entre la proteína y el monóxido, son especialmente amplificados en la circulación placentaria. La HbF tiene un P_{50} de 19,4 mm/Hg, lo cual facilita la captura del O_2 de la hipóxica sangre materna en el útero, en donde la presión parcial del O_2 es de 28 mm. Como en la sangre arterial materna la saturación con O_2 es de 75 a 80%, el feto es sensible a los pequeños cambios en la tensión del O_2 . Así, pequeñas cantidades de HbCO pueden alterar el transporte del O_2 en el feto. Veamos un ejemplo: una mujer embarazada que fume 20 cigarrillos al día, puede tener fácilmente una concentración sanguínea de CO de 6%. Esto reducirá la P_{50} materna de 26 a 23 mm/Hg y la presión parcial de O_2 venosa uterina de 38 a 32 mm, produciendo un descenso en la gradiente de difusión que lleva el O_2 a través de la placenta. Por ende, la tensión del O_2 de la sangre del cordón umbilical se reducirá de 28 a 22 mm y la saturación de O_2 de la sangre arterial fetal caerá de 75 a 58%.

Trastornos del equilibrio ácido-básico

En la acidosis aguda el aumento de la P_{50} favorece la descarga del O_2 de la Hb. En la acidosis crónica una reducción compensatoria de la concentración del 2,3-DPG eritrocitario restablece el valor de la P_{50} hasta valores cercanos a los normales, a pesar del bajo pH. La alcalemia tiene dos efectos: reduce la perfusión sanguínea cerebral, porque causa vasoconstricción, y deteriora la liberación del O_2 , porque baja la P_{50} .

La corrección agresiva de una acidosis crónica tiene consecuencias que van en detrimento del paciente con una insuficiencia preexistente, respiratoria, cardíaca o cerebrovascular. Esto se debe a que el paciente no puede aumentar adecuadamente la ventilación, ni el gasto cardíaco, ni la perfusión regional, para compensar el aumento en la afinidad de la Hb por el O_2 .

Esto quiere decir que en el paciente que sufre una exacerbación de una acidosis respiratoria crónica que requiere ventilación mecánica, se debe evitar la normalización agresiva de la tensión arterial del CO_2 . De manera similar, en pacientes que tienen cetoacidosis diabética o acidosis láctica, la infusión agresiva de HCO_3^- para corregir el pH de la sangre puede alterar la liberación del O_2 en los tejidos, a una determinada saturación arterial de O_2 . Asimismo, puesto que el rápido aumento del pH sanguíneo debido al HCO_3^- no se equilibra inmediatamente a través de la barrera hemato-encefálica, el tejido

nervioso central permanece acidótico, manteniendo una alcalosis secundaria y exagerando los efectos del aumento del pH, pudiendo desarrollarse síntomas de tetania, aun antes de que la concentración de HCO_3^- alcance valores normales.

En la alcalosis metabólica crónica un descenso de la P_{50} favorece la carga de O_2 pulmonar, pero puede alterar la liberación del O_2 en pacientes con enfermedad vascular periférica. Ocurre entonces un aumento compensatorio en la concentración de 2,3-DPG eritrocitario, en unas 24 horas, con el objeto de llevar la P_{50} a los valores normales.

BIBLIOGRAFÍA

A specific chemical difference between the globins of normal human and sickle-cell anaemia haemoglobin. *Nature* 1956; 178: 792-794.

Anderson K. The porphyrias. En: Goldman L, Ausiello D. *Cecil medicine*. 23 ed. Pa: Saunders Elsevier; 2007.

Bain B, Gupta R. *A-Z of haematology*. Blackwell Publishing; 2007.

Devlin TM. *Textbook of biochemistry with clinical correlations*. 6 ed. EEUU: Wiley-Liss; 2006.

Herrick JB. Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. *Arch Intern Med* 1910; 6(5): 517-521.

Hoffbrand AV, Catovsky D, Tuddenham E, Green AR. *Postgraduate haematology*. 6 ed. Wiley- Blackwell; 2011.

Hoffman R, Benz EJ Jr, Furie B, McGlave P, Silberstein L, Shattil SJ. *Hoffman Hematology: Basic principles and practice*. 5 ed. New York: Churchill Livingstone; 2008.

Kaushansky K, Lichtman MA, Beutler E, Kipps TJ, Seligsohn U, Prchal JT. *Williams Hematology*. 8 ed. China: McGraw-Hill Companies; 2010.

Lieberman M, Marks AD. *Marks: bioquímica médica básica. Un enfoque clínico*. 4 ed. EEUU: Lippincott Williams & Wilkins; 2013.

McKee T. *Bioquímica: las bases moleculares de la vida*. 4 ed. México: McGraw-Hill; 2009.

Murray R, Harper: *Bioquímica ilustrada*. 28 ed. México: McGraw-Hill; 2010.

Nelson DL, Cox MM. *Lehninger, principles of biochemistry*. 4 ed. EEUU: W.H. Freeman and Company; 2004.

Nelson D, Cox M. *Lehninger: Principles of biochemistry*. 5 ed. EEUU: W.H. Freeman and Company; 2008.

Pauling L, Itano H, Singer S, Wells I. Sickle cell anemia, a molecular disease. *Science* 1949; 110: 543-548.

Provan D. *ABC of clinical haematology*. 3 ed. Oxford: Blackwell Publishing; 2007.

Savitt TL, Goldberg MF. Herrick's 1910 Case report of sickle cell anemia: the rest of the story. *JAMA* 1989; 261(2): 266-271.

Smith G. *Problem solving in haematology*. Oxford: Clinical Publishing; 2010.

Stokvis B. Over twee zeldsame kleurstoffen in urine van zieken. *Need Tijd Geneesk* 1989; 13: 409-417.

3

EL SÍNDROME ANÉMICO

Dr. Germán F. Sáenz Renauld
Dra. María Rodríguez Sevilla

INTRODUCCIÓN

La anemia se define como la reducción mayor al 10% de la masa eritrocítica, respecto a la cifra normal. El límite varía según la edad, la altura sobre el nivel del

mar y el sexo. Algunas pruebas más sencillas, aunque indirectas, son indicativas de la presencia de anemia, e incluyen el conteo de glóbulos rojos, el hematocrito y la concentración de hemoglobina (Cuadro N° 1).

Cuadro N° 1. Valores normales de las células sanguíneas en la población normal adulta		
Medida	Unidades	Valor normal
Hemoglobina (Hb)	g/dl	Hombres 13,5-17,5 Mujeres 12,0-16,0
Hematocrito (Hto)	%	Hombres 40-52 Mujeres 36-45
Conteo de eritrocitos	$\times 10^6/\text{mL}$	Hombres 4,5-6,0 Mujeres 4,0-5,4
Volumen Corpuscular Medio (VCM)	fL	81-99
Hemoglobina Corpuscular Media (HCM)	pg	30-34
Concentración Media de Hemoglobina Corpuscular (CHCM)	g/dl	30-36
Amplitud de distribución del tamaño de los eritrocitos (RDW)	%	12-14 (depende del instrumento)
Reticulocitos	%	0,5-1,5
	$\times 10^3/\text{mL}$	25-75

La médula ósea se encarga de mantener y regular el tamaño de la masa eritrocítica. Por lo tanto, esta depende del equilibrio entre la producción y la destrucción o pérdida de glóbulos rojos.

El resultado de la disminución en la cantidad de glóbulos rojos circulantes es la hipoxia tisular, derivada de la reducción en la capacidad de transporte de oxígeno.

ERITROPOYESIS

La masa eritrocítica en condiciones normales se mantiene relativamente estable. Para lograr esto es necesario mantener un adecuado control de la producción, respecto a la destrucción de los eritrocitos.

La función principal de los glóbulos rojos es el transporte de oxígeno; por eso, cuando dichos glóbulos disminuyen se produce una hipoxia tisular. Esta hipoxia es la que estimula la eritropoyesis. A nivel renal, las células del aparato yuxtaglomerular responden a la hipoxia tisular aumentando la producción de eritropoyetina.

En la médula ósea, las células madre pluripotenciales se diferencian y llegan a ser progenitores comprometidos hacia la línea de granulocitos y eritrocitos. Al proliferar forman brotes, los cuales a su vez se multiplican, creando colonias. La eritropoyetina inhibe la apoptosis (muerte celular programada) y estimula la diferenciación eritroide, de manera que permite la proliferación

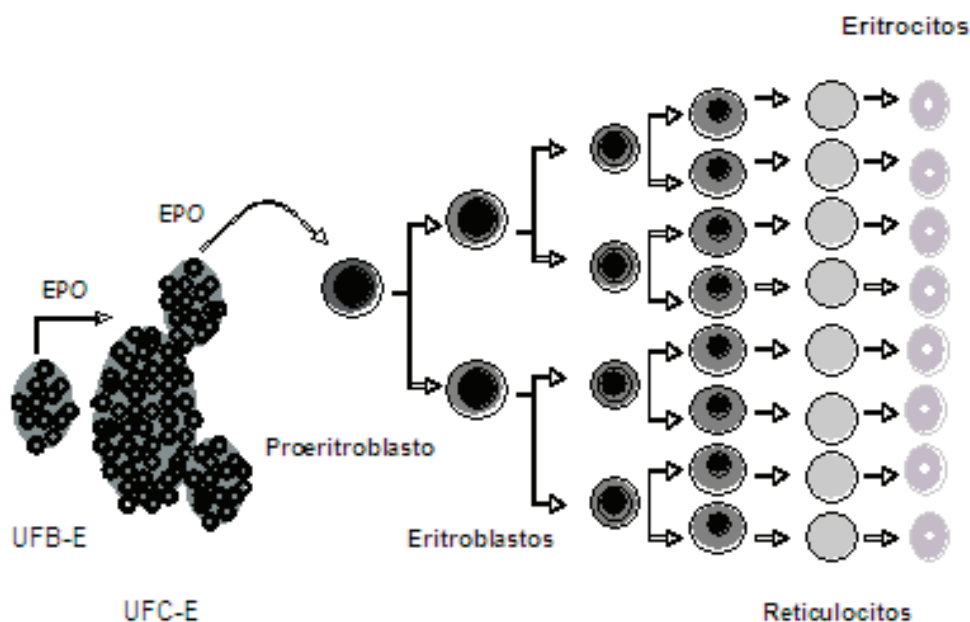
y maduración de esta línea celular. No tiene efecto sobre el desarrollo de los precursores tempranos ni en el desarrollo de los brotes eritroides. En estas etapas iniciales son otras citoquinas menos específicas las que actúan estimulando la proliferación y diferenciación celular, tales como el "stem cell factor" (SCF), la interleucina 3 (IL-3), la interleucina 4 (IL-4) y el factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF). Sin embargo, la acción de la eritropoyetina es fundamental en el desarrollo de la línea eritroide, a partir de la maduración de los brotes eritroides y de la formación de colonias. Tampoco actúa en etapas posteriores de la eritropoyesis, después de la formación del proeritroblasto.

En la serie roja medular, todo elemento identificable está destinado a madurar y es la concentración de Hb la que determina la cesación de la actividad nuclear.

El proeritroblasto sufre una serie de divisiones mitóticas y de etapas de maduración, en donde los distintos tipos de eritroblastos maduran y van incorporando la hemoglobina en su citoplasma.

En la médula ósea existen unidades anatómicas y funcionales, conocidas como islas eritropoyéticas; estas se hallan constituidas por un histiocito o macrófago central, rodeado de una serie de eritroblastos en diversos estadios de maduración.

Los estadios madurativos de la serie roja son: proeritroblasto, eritroblasto basófilo, eritroblasto policromatófilo, eritroblasto ortocromático, reticulocito y eritrocito (Figura N° 1). Las mitosis cesan en la etapa del ortocromático, en tanto que la hemoglobinogénesis persiste aún en el reticulocito. Este último sale de la médula después de dos o tres días de maduración.



EPO= eritropoyetina; **UFB-E**= unidades formadoras de brotes-eritroides; **UFC-E**= unidades formadoras de colonias eritroides.

Figura N° 1. Eritropoyesis normal.

Debido a un exceso relativo del área de superficie en relación con el volumen, esta célula se convierte en un elemento blando y plegable, de gran elasticidad, que le permite atravesar la microcirculación sin mayores problemas.

De esta forma, la disminución de glóbulos rojos produce reducción de la oxigenación tisular, lo cual es detectado a nivel renal y resulta en el aumento de eritropoyetina, que a su vez, incrementa la eritropoyesis en la

médula ósea y compensa la disminución de glóbulos rojos. Ante el estímulo de la eritropoyetina, aparecen eritroblastos en la médula ósea entre dos y cuatro días después. En la circulación aparecen los reticulocitos entre tres y siete días después del estímulo inicial, se mantienen como tales durante dos días y luego maduran para formar eritrocitos. Estos, a su vez, se mantienen en la circulación durante 120 días, hasta que son destruidos por el bazo.

Cuando el transporte de oxígeno a los tejidos disminuye, independientemente de la causa, la respuesta de las células del aparato yuxttaglomerular será la misma que para la disminución del número de eritrocitos. Por tanto, la eritropoyesis se ve modificada por diversos factores:

- γ Aumenta cuando el transporte de oxígeno es insuficiente (anemia y trastornos cardíacos o pulmonares que producen hipoxemia).
- γ Aumenta cuando disminuye la tensión de oxígeno (grandes altitudes).
- γ Disminuye cuando la tensión es mayor (a nivel del mar).

EL ERITRÓN Y LA ERITROPOYESIS DESDE EL PUNTO DE VISTA FUNCIONAL

Se denomina eritrón al conjunto compuesto por todos los progenitores eritroides y los eritrocitos maduros. Diariamente se producen 20-25 ml de eritrocitos por kilo de peso, lo cual equivale al 1% del eritrón circulante por día. En condiciones normales, por cada 100 eritrocitos hay tres precursores (1,5 eritroblastos y 1,5 reticulocitos) en la médula ósea y un reticulocito circulando (Cuadro N° 2).

La producción neta de eritrocitos a partir de cada proeritroblasto es aproximadamente de 50 eritroblastos y 110 reticulocitos, derivados de cinco divisiones mitóticas que ocurren en cinco días. La transformación final del reticulocito se acompaña de una pérdida considerable de volumen por deshidratación y pérdida de organelas.

Cuadro N° 2. Componentes del Eritrón en un hombre de 70 kg				
Tipo celular	N° de cel/kg (x10 ⁹)	N° relativo de células	Volumen estimado de c/célula (ml)	Volumen total de cada compartimiento celular (ml)
MO				
Eritroblastos	5	1,5	250	88 eritrón fijo
Reticulocitos	5	1,5	120	44 (6% en MO)
S. Periférica				
Reticulocitos	3,3	1	100	23 eritrón móvil
Eritrocitos	330	100	90	2.000 (94% en SP)

El diagnóstico de la causa de una anemia requiere un abordaje del paciente en términos de eritrogénesis; para su evaluación, se emplean en clínica los siguientes métodos:

1. Producción eritrocítica. La producción eficaz de eritrocitos puede analizarse mediante:
 - a. El conteo de reticulocitos.
 - b. La relación granulocitos: eritroblastos (G:E) en médula ósea.
 - c. Estudios de ferroquinesis (medición del tránsito del hierro radioactivo).
2. Destrucción eritrocítica, la cual se evalúa por medio del grado de catabolismo de la Hb (bilirrubina indirecta, urobilinógeno).

En condiciones normales, la eritropoyesis total es la suma de la eritropoyesis eficaz (90-95%) y la ineficaz (5-10%). Se mide con base en el número total de eritroblastos.

La eritropoyesis eficaz se refiere a la producción de Hb que llega a la circulación; mientras que la ineficaz es aquella que nunca origina reticulocitos viables de alcanzar la circulación. Esta condición se conoce como hemólisis intramedular (muerte de los eritroblastos y de los propios reticulocitos en la médula ósea por diversos mecanismos).

En los estudios del tránsito del Fe 59 (ferroquinesis) se demuestra normalmente que del 70 al 75% del isótopo es tomado por la médula ósea a los 90 minutos de inyectado (eritropoyesis total) y que a las dos semanas el 85% de ese Fe se halla incorporado a los eritrocitos circulantes (eritropoyesis eficaz). El cómputo de reticulocitos es un fiel reflejo de esta última.

En general, 100 ml de eritrocitos contienen 33 g de Hb; 23 ml poseerán aproximadamente 7,6 g. Ahora bien, 1 g de Hb posee 3,7 mg de hierro, por lo que 7,6 g contendrán 28 mg de hierro. Lo anterior corresponde a la cantidad necesaria para la eritropoyesis fisiológica diaria y es, asimismo, la cantidad que se produce diariamente por la destrucción fisiológica de la hemoglobina.

CLÍNICA DEL PACIENTE ANÉMICO

Es necesario tener presente que la anemia no es una enfermedad en sí, sino el signo, de enorme valor representativo en clínica, de una entidad que la provoca. Cualquiera que sea la causa, la anemia llega a condicionar una disminución de la capacidad de transportar oxígeno a los tejidos.

Cabe destacar que en el paciente anémico la aparición de las manifestaciones clínicas y la gravedad de estas dependen de varios factores:

1. Velocidad de instauración de la anemia.
2. Mecanismos de compensación.
3. Grado de hipoxia tisular.
4. Carencia de un factor particular o enfermedad de fondo.

La anemia que se desarrolla rápidamente puede producir síntomas por hipotensión e hipovolemia, como sucede en pacientes con sangrado agudo. Por lo general, cuando la anemia se desarrolla de manera rápida, sin tiempo para el ajuste fisiológico, los síntomas no específicos tienden a ser prominentes. Cuando la anemia se desarrolla lentamente, los ajustes fisiológicos pueden ser tan perfectos que aun pacientes muy anémicos pueden tener pocos o ningún síntoma no específico. Usualmente predominan los datos correspondientes a la hipoxia tisular o incluso los debidos al factor causal.

Los mecanismos de compensación incluyen:

1. Disminución de la afinidad por el oxígeno: es una de las medidas más tempranas y menos costosas para el organismo y es mediada, especialmente, por un aumento en el 2,3-bifosfoglicerato (DPG).
2. Aumento de la perfusión tisular: permite que haya vasoconstricción predominante en piel y a nivel renal, lo cual disminuye la perfusión en estas áreas. De esta forma, se redistribuye el flujo sanguíneo y se mantiene una adecuada perfusión y oxigenación a nivel cardíaco, muscular y en el sistema nervioso central.
3. Aumento del gasto cardíaco: es un mecanismo compensatorio que resulta excelente, pero que a su vez implica un gasto energético alto.
4. Aumento en la producción de glóbulos rojos: mediado por el incremento de la síntesis de eritropoyetina a nivel renal. Este constituye el mecanismo más lento, pero altamente correctivo.

Factores determinantes de la anemia

Los principales factores que determinan el impacto de la anemia en un paciente específico son: el nivel de hemoglobina, la velocidad de instauración de la anemia, la edad, la presencia de cardiopatía u otras patologías asociadas, así como la condición física y el grado de actividad de la persona.

El nivel de hemoglobina en el cual aparecen los síntomas causados por la anemia varía de manera considerable, según los parámetros mencionados; sin embargo, pacientes jóvenes sin otras patologías asociadas, generalmente resultan sintomáticos cuando la hemoglobina es menor de 7-8 g/dl, aunque en pacientes cardiopatas esta cifra puede aumentar a 9-10 g/dl.

La palidez es a menudo el primer signo que sugiere anemia, pero este es un índice inexacto. Los síntomas más comunes son debilidad, cansancio, palpitaciones, disnea de esfuerzos o cefalea. Algunos hallazgos son producto del compromiso del sistema cardiovascular. Es común el aumento de la frecuencia cardíaca, así como la presencia de soplos cardíacos, especialmente sistólicos en el ápex y a lo largo del borde externo izquierdo. Eventualmente, se desarrolla una insuficiencia cardíaca de alto gasto. En pacientes con antecedentes de insuficiencia cardíaca, esta puede ser la manifestación inicial. De igual manera, las personas con enfermedad arterial coronaria, cerebrovascular o de miembros inferiores, pueden presentar angina, infarto, isquemia cerebral transitoria o claudicación intermitente, según sea el caso.

En la segunda categoría de signos y síntomas se encuentran los hechos específicos y hallazgos físicos relacionados con el desorden primario que provoca la anemia. Por ejemplo, ante una pérdida súbita de sangre, los signos y síntomas de la hipovolemia son prominentes. Cuando ocurre una rápida destrucción sanguínea aparece ictericia y algunas veces fiebre, dolor abdominal e incluso hemoglobinuria. Cuando la producción sanguínea es defectuosa, la anemia tiende a desarrollarse en forma lenta y los signos específicos se relacionan directamente con órganos individuales comprometidos en el proceso de la enfermedad primaria. Quiere decir, entonces, que a la presentación clásica del cuadro anémico *per se*, pueden añadirse las siguientes manifestaciones:

1. Las que dependen del mecanismo patogénico de la anemia; por ejemplo, ictericia, hepato y esplenomegalia en las anemias hemolíticas, así como manifestaciones de sangrado en el caso de anemia por pérdida crónica de sangre.

2. En las anemias carenciales (como anemia ferropriva o anemia megaloblástica), los síntomas predominantes pueden corresponder a aquellos causados por la deficiencia en sí o por la afección de otros órganos producto de la misma deficiencia.
3. Las que dependen de la alteración de otras células sanguíneas; por ejemplo, púrpura si existe trombocitopenia, así como pequeñas úlceras superficiales de la mucosa oral y mayor susceptibilidad a infecciones si existe neutropenia.
4. Si el cuadro anémico es secundario a endocrinopatía, infección crónica, insuficiencia renal o neoplasia maligna, además de las manifestaciones del cuadro anémico, existirán aquellas que dependen del proceso primario, aunque en ocasiones son tan discretas que pueden pasar inadvertidas si no se buscan en forma intencional. La valoración juiciosa de estas manifestaciones, después de la búsqueda intencional, permite avanzar en forma importante en el diagnóstico.

Tomando en cuenta lo señalado anteriormente, se debe considerar que el examen físico de un paciente anémico deberá incluir análisis de piel, ojos, boca, corazón, abdomen, ganglios y sistema nervioso. Esto con el fin de descubrir la causa de anemia, para poder corregir el defecto fundamental.

ABORDAJE DEL PACIENTE ANÉMICO

El estudio de la anemia y la elaboración de un diagnóstico definido requieren un minucioso análisis de la condición clínica del sujeto y una adecuada evaluación de los exámenes de laboratorio, que por lo general incluyen:

1. Hemograma: comprende el conteo de eritrocitos, plaquetas y leucocitos, además de la medición del volumen corpuscular medio (VCM) y la hemoglobina corpuscular media (HCM).
2. Frotis de sangre periférica.
3. Conteo de reticulocitos.
4. Niveles de hematínicos, incluyendo los niveles de ácido fólico, vitamina B₁₂, hierro sérico, capacidad de fijación de la transferrina, porcentaje de saturación y ferritina.
5. Electroforesis de hemoglobina.
6. Evaluación de la médula ósea, que abarca el aspirado y la biopsia.

Reticulocitos

El recuento de reticulocitos (R) es un medio útil y simple para evaluar la capacidad funcional de las células eritropoyéticas de la médula ósea, es decir, la eritropoyesis eficaz. El significado del porcentaje de reticulocitos está en relación con la gravedad de la anemia. Con el fin de calcular el índice de producción de reticulocitos (o índice reticulocítico) por la médula, se deben hacer dos ajustes al reporte porcentual.

Se obtiene el porcentaje corregido o ajustado de R, toda vez que el porcentaje de R se corrige ante la presencia de un recuento anormal del eritrón. Por acuerdo convencional, para tales cálculos se utiliza el hematocrito con un valor normal de 45%:

$$R \text{ corregidos} = \frac{\text{Hto. Paciente} \times R}{45}$$

Este porcentaje corregido es semicuantitativo.

Se hace una segunda corrección de los R (un día o dos de anterioridad), para tomar en cuenta la liberación prematura de R de la médula ósea en pacientes anémicos y con reticulocitosis marcada. La corrección se hace en proporción a la severidad de la anemia, puesto que la liberación prematura de los R de la médula ósea es proporcional a la deficiencia de hemoglobina (Figura N° 2). Esta corrección dará el índice de producción de R (IR):

$$IR = \frac{R \text{ corregidos}}{2}$$

En el capítulo referente a cómputo de R, el lector podrá encontrar un normograma que permite obtener directamente el IR.

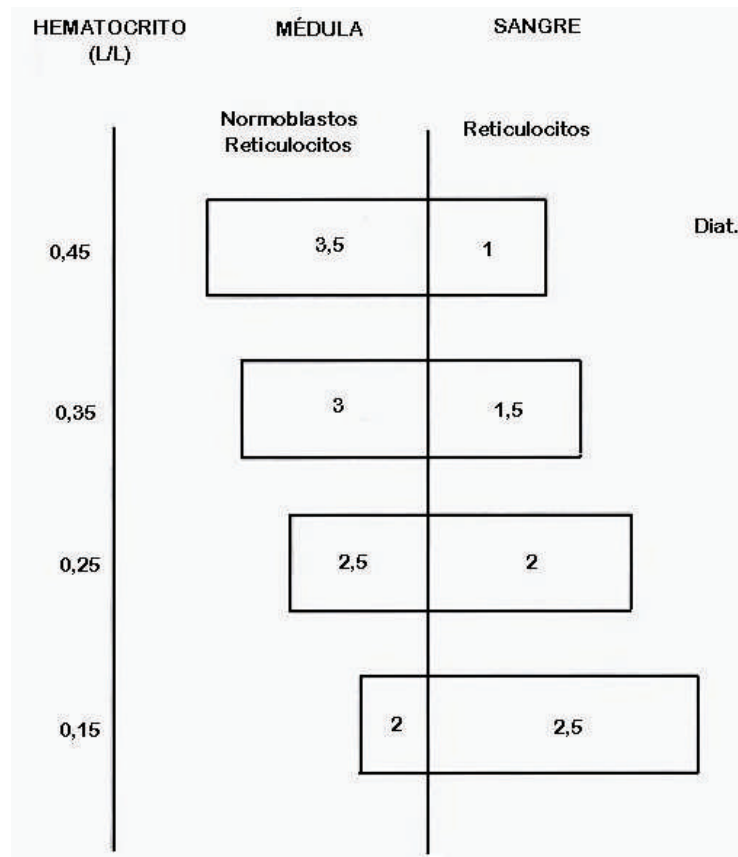


Figura N° 2. Relación entre el hematocrito y el período de maduración reticulocitario en la sangre periférica.

Cálculos con base en el cómputo absoluto de R:

$$IR = \frac{75.000}{50.000} = 1,5 \quad ; \quad \frac{1,5}{2} = 0,75$$

Con base en el Hto.:

$$\frac{25 \times 3}{45} = 1,66 \quad ; \quad \frac{1,66}{2} = 0,8$$

Contenido reticulocitario de hemoglobina (CHr)

El contenido reticulocitario de hemoglobina, CHr, también conocido como Ret He, es un índice obtenido mediante ciertos equipos automatizados; se utiliza especialmente en pacientes con deficiencia de hierro, a fin de ver su respuesta al tratamiento. Este índice refleja un balance mucho más real entre el hierro y la eritropoyesis, de lo que refleja el otro índice (el HCM). El punto de quiebre para el CHr es de 26 pg. Un valor menor a ese tiene una sensibilidad del 100% y una es-

pecificidad del 80% en predecir deficiencia de hierro. Ante un tratamiento eficaz, los pacientes responden con un CHr mayor de 26 pg dentro de las 48 horas de iniciado el tratamiento. De esta manera, el laboratorio puede indicarle al médico en un tiempo menor esta útil información, ya sea para persistir en el tratamiento o para una investigación adicional, en caso de que no haya respuesta.

CLASIFICACIÓN FISIOPATOLÓGICA DE LA ANEMIA

Según los mecanismos fisiopatológicos, la anemia se divide en dos grandes grupos (Cuadro N° 3):

- Anemias regenerativas: por sangrado o aumento en la tasa de destrucción de los eritrocitos (hemólisis). En estos casos el IR debe ser mayor de 2.
- Anemias arregenerativas: por disminución en la producción (eritropoyesis inadecuada o insuficiente). El IR es menor o igual a 2.

Cuadro N° 3. Clasificación fisiopatológica de las anemias	
Anemia arregenerativa	
1. Trastorno de la producción de la célula madre	Anemia aplásica
2. Síndrome mielodisplásico	
3. Infiltración de la médula ósea	Carcinomatosis medular Enfermedad hematológica maligna
4. Disminución en la proliferación de la serie eritroide	Anemia de la insuficiencia renal Anemia de las endocrinopatías Aplasia pura de la serie roja
5. Alteración de la síntesis del ADN eritroide	Anemia megaloblástica
6. Alteración en la síntesis de la hemoglobina	Carencia de hierro Anemia por enfermedad crónica Talasemias
Anemia regenerativa	
1. Sangrado	
2. Hemólisis	
a. Alteraciones intracorporales	
i. Defectos de la membrana: esferocitosis hereditaria, eliptocitosis hereditaria	
ii. Deficiencias enzimáticas: deficiencia glucosa 6 fosfato deficiencia piruvato quinasa	
iii. Hemoglobinuria paroxística nocturna	
b. Alteraciones extracorporales	
i. Hemólisis mediada por anticuerpos	
ii. Agentes químicos: drogas, toxinas	
iii. Fragmentación: hemólisis microangiopática: púrpura trombótica trombocitopénica, síndrome urémico hemolítico, síndrome de HELLP hemoglobinuria de la marcha válvulas disfuncionantes	

Con exclusión de la pérdida repentina y masiva de sangre, el cuadro anémico puede deberse, en términos generales, a una inadecuada producción sanguínea, a hemólisis o a una combinación de los dos. Este punto de vista tan sencillo es muy útil, ya que inclina nuestra atención básicamente a implicaciones etiológicas.

Anemia por eritropoyesis insuficiente (arregenerativa)

Las anemias arregenerativas pueden ser causadas por:

1. **Síntesis deficiente de la hemoglobina.** En la gran mayoría de los casos, esta se produce por deficiencia de hierro; sin embargo, también puede ser causada por hemoglobinopatías (talasemias), anemia sideroblástica o intoxicación por plomo.

La anemia por deficiencia de hierro es microcítica e hipocrómica, y las reservas de hierro consumidas se reflejan por la ausencia de hemosiderina en la médula ósea. Las personas normales requieren poco hierro de la dieta. La dieta de los países occidentales contienen suficiente hierro para mantener un balance, pero el margen es pequeño.

Para efectos prácticos, la deficiencia de hierro en el ser humano se debe a pérdida de sangre. Esta deficiencia es más común en mujeres, lo cual se explica fácilmente por las demandas incrementadas que causan las pérdidas normales de sangre durante la menstruación, el embarazo, el parto y en la lactancia.

Las demandas incrementadas del hierro durante el crecimiento, en ocasiones pueden provocar

deficiencia de hierro en niños, sobre todo cuando la dieta se halla en límites subóptimos.

En lo que respecta a las hemoglobinopatías y al envenenamiento por plomo, el defecto básico se encuentra en la síntesis de hemoglobina.

Ciertos casos de anemia sideroblástica responden a la terapéutica con piridoxina. El mecanismo exacto no es claro, pero la anemia es usualmente microcítica.

- 2. Trastornos en la síntesis del DNA (maduración nuclear anormal).** La maduración nuclear anormal ocurre en la deficiencia de vitamina B₁₂ y de ácido fólico, así como en casos de mielodisplasia o en condiciones malignas (eritrolecemia). Estas dos últimas son refractarias a todo el tratamiento vitamínico. En vista de que un número suficiente de eritrocitos no alcanza la circulación, la anemia empeora de manera progresiva y el cómputo de reticulocitos es bajo.

Después de que la anemia megaloblástica es confirmada, debe realizarse una cuantificación sérica de vitamina B₁₂ y de ácido fólico, estudio de autoanticuerpos, estudios de grasa fecal y estudios endoscópicos del tracto gastrointestinal, con el fin de diferenciar, precisamente, la anemia perniciosa de otros tipos de anemias megaloblásticas. Estas últimas incluyen deficiencias de vitamina B₁₂ después de una gastrectomía total o de una dieta deficitaria muy prolongada, o por una inadecuada absorción de la vitamina debida a síndromes de mala absorción, en desórdenes mieloproliferativos y en algunos estados hemolíticos crónicos. Dentro de las anemias megaloblásticas refractarias están aquellos casos raros que ocurren sin que haya deficiencia de vitamina B₁₂ o de ácido fólico. Evidentemente, tales pacientes no responden a la terapéutica con esos agentes.

- 3. Otros tipos raros de eritropoyesis defectuosa o insuficiente.** Aquí se ubican la anemia aplásica, la aplasia pura de serie roja, la anemia sideroblástica y los síndromes mielodisplásicos. Estos defectos envuelven una verdadera falla medular, puesto que la producción diaria no compensa la destrucción promedio normal de los eritrocitos viejos. Usualmente, el número producido de las plaquetas y de granulocitos también es insuficiente, por lo que la anemia aplásica se puede asociar con trombocitopenia y granulocitopenia. En la médula es hipoplástica y la pancitopenia es frecuente. En vista de que los signos y los hallazgos de laboratorio a menudo son menos específicos en esta clase de anemias, respecto a los ya discutidos, es importante que an-

tes de hacer el diagnóstico, en casos individuales, se excluyan otros tipos mayores de anemia.

El cuadro leucoeritroblástico se reconoce por la presencia de eritroblastos y de granulocitos inmaduros en frotis sanguíneo. Este tipo de anemia suele estar asociada con infiltración de médula ósea por células neoplásicas, lo que debe poner inmediatamente alerta al médico acerca de la posibilidad de que el paciente tenga una carcinomatosis diseminada o mieloma múltiple. Asimismo, se observa este tipo de anemia en la mielofibrosis y en los granulomas medulares de cualquier tipo.

La aplasia pura de serie roja es un desorden raro, que puede ocurrir como una enfermedad congénita. También se ha encontrado en la deficiencia de riboflavina, en presencia de anticuerpos antieritropoyesis y algunas veces en timoma. Estas son condiciones raras, pero importantes de considerar, en vista de que su presencia puede llevar a un diagnóstico definitivo, más allá de lo usual o de lo frecuente en hematología.

En cuanto a la anemia sideroblástica, esta es fácil de identificar, ya que en los eritroblastos medulares se encuentran un gran número de gránulos gruesos de hemosiderina, los cuales a menudo rodean por completo el núcleo celular. Algunas de estas células son destruidas en la propia médula (eritropoyesis ineficaz). La eritropoyesis ineficaz es la regla en los síndromes mielodisplásicos.

Anemias hemolíticas (regenerativas)

La hemólisis se caracteriza por ictericia y anemia. La gran capacidad de reserva de la médula ósea normal para producir o para incrementar la producción sanguínea, y del hígado por excretar el exceso de bilirrubina, permite ver cuadros hemolíticos sin reducción de la masa eritrocítica y sin mayor ictericia clínica. Cuando la anemia se presenta, los hallazgos de laboratorio reflejan, en primer lugar, incremento de destrucción eritrocítica, reducción de los niveles de haptoglobinas, niveles altos de bilirrubina indirecta, valores elevados de urobilinógeno en orina y heces y posiblemente, cuando se trata de hemólisis intravascular, hemoglobinemia, hemosiderinuria y hemoglobinuria. En segundo término, se observa una hiperplasia típica de la médula ósea, que compromete no solo a los eritrocitos, sino también, inespecíficamente, a los granulocitos y megacariocitos.

La hemólisis se produce por defectos intrínsecos del eritrocito o por anomalías extracorpúsculares. Los defectos eritrocíticos intrínsecos incluyen las hemoglobinopatías, la esferocitosis hereditaria, la

deficiencia hereditaria de enzimas y algunos defectos adquiridos. Estudios electroforéticos adecuados y de bioquímica hematológica pueden identificar estos desórdenes, los cuales se deben a anormalidades en la síntesis o en el grado de síntesis de la molécula de la hemoglobina, de las enzimas o de la membrana. De particular interés para nuestros pueblos son la anemia drepanocítica (SS), la anemia doble heterocigota SC y los síndromes talasémicos puros o en asociación con hemoglobina S o C.

En el caso específico de la esferocitosis hereditaria, esta se debe a un defecto de membrana. Al respecto, es importante recordar que los esferocitos de esta condición son sensibles a soluciones hipotónicas.

Tanto el ciclo glucolítico o anaerobio de Embden-Meyerhof, como el ciclo oxidativo de la pentosa fosfato, son esenciales para una sobrevivencia normal del eritrocito. Un defecto enzimático en cualquier vía de las mencionadas lleva a la producción de eritrocitos anormales, lo que origina un complejo de anemias conocido como anemia hemolítica congénita no esferocítica. Buenos ejemplos de estos problemas son los tipos de deficiencia de la deshidrogenasa de la glucosa-6-fosfato. Defectos intrínsecos adquiridos, como la hemoglobinuria paroxística nocturna, son el resultado del mismo problema básico, es decir, membrana celular defectuosa.

Anormalidades extracorpúsculares se generan por drogas y agentes químicos, enfermedades infecciosas y otras de diferente etiología, mecanismos inmunes y trauma mecánico. En vista de que estas categorías se traslapan, los mecanismos necesitan ser aclarados. Por ejemplo, determinadas drogas tienen un efecto hemolítico directo sobre los eritrocitos, dependiendo de la dosis. En algunos, la reacción es idiosincrática; en otros, el efecto es producido a través de mecanismos inmunes. De manera similar, ciertas infecciones, como la malaria, atacan los eritrocitos de manera directa, mientras la producción estimulada de anticuerpos por otros microorganismos lleva a una subsecuente hemólisis. Además, varios tipos de anticuerpos se encuentran comprometidos en mecanismos inmunes de la anemia hemolítica.

Como se mencionó, muchas drogas y agentes químicos están implicados en anormalidades extracorpúsculares. La reacción hemolítica a la droga puede depender de una sensibilidad inducida por una exposición previa. Algunas de estas drogas son el prebenecid, la quinidina, las fenotiazinas, las sulfonamidas y el ácido paraaminoalíclico. Las reacciones hemolíticas ocasionales a la penicilina y a la alfametildopa

dependen de un mecanismo inmune y la prueba de Coombs es positiva.

Las infecciones prominentes que atacan a los eritrocitos son la malaria, la bartonelosis y los clostridios. Otras enfermedades que condicionan hemólisis están asociadas usualmente con esplenomegalia; por ejemplo, linfomas, leucemias y esplenomegalia congestiva.

La anemia hemolítica puede deberse también a varios tipos de mecanismos inmunes. La hemólisis atribuible a los grupos sanguíneos y a anticuerpos Rh causan reacción hemolítica transfusional, enfermedad hemolítica transfusional y enfermedad hemolítica en el recién nacido. La mayoría de las anemias hemolíticas autoinmunes se deben a la unión de los eritrocitos con globulinas reactivas contra la misma célula. Esas células sensibilizadas se aglutinan *in vitro* en presencia de antiglobulina humana (prueba de Coombs directa). Aproximadamente la mitad de los casos ocurren en enfermedades crónicas, como linfomas, leucemia linfocítica crónica, LED, mononucleosis infecciosa y algunas otras infecciones virales. En el remanente de los casos no se logra detectar una enfermedad de fondo, por lo que cabe el diagnóstico de anemia hemolítica autoinmune idiopática. Se ha comprobado que en muchos casos se logra evidenciar un desorden en unos pocos años.

Por otra parte, se tiene conocimiento que el trauma mecánico hacia las células rojas causa anemia hemolítica, una complicación muy común en pacientes con válvulas cardíacas artificiales. La turbulencia sanguínea daña algunos eritrocitos, los cuales, de no destruirse en forma total en la circulación, son subsecuentemente secuestrados y removidos por el bazo. La anemia hemolítica microangiopática se caracteriza por la presencia de microesferocitos y una peculiar poiquilocitosis eritrocítica (esquizocitos).

La deposición fina de la fibrina en la microcirculación sucede cuando el endotelio es dañado por vasculitis. El mismo fenómeno puede ocurrir en pacientes con enfermedad vascular hipertensiva, uremia o condiciones neoplásicas diseminadas. En estos casos se reflejará la misma alteración eritrocítica citada y, por lo tanto, el fenómeno hemolítico crónico intra y extravascular.

CLASIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE LA ANEMIA

Lo importante en el estudio de las anemias es identificar la causa fundamental que provoca el cuadro anémico y este es el objeto primordial del diagnóstico. La clasificación morfológica de la anemia es útil para el diagnóstico, ya que caracterizarla según las dimen-

siones y el contenido hemoglobínico de los eritrocitos, dirige la futura investigación hacia un grupo definido de posibles factores causales o síndromes clínicos y excluye otros de toda consideración. Esta clasificación tiene la ventaja de ser sencilla y de que utiliza los datos disponibles en la mayoría de los hemogramas.

Se reconocen tres grupos fundamentales: la anemia normocrómica-normocítica, la anemia hipocrómica-microcítica y la anemia macrocítica, las cuales se describen brevemente a continuación. Además, se incluyen los flujogramas utilizados para el diagnóstico de la mayoría de las causas de anemia, de acuerdo con el criterio morfológico (índices eritrocíticos obtenidos con contadores electrónicos).

Anemia normocrómica-normocítica

Es aquella anemia cuyos índices hematimétricos son normales, con un frotis anisopoiuilocítico de grado variable. El VCM se halla entre 85 y 100 ml, y la HCM entre 28-32 g/dl. Este tipo morfológico de anemia es, por lo general, el resultado de una disminución de la producción medular (endocrinopatías, anemia aplásica, leucemia, mieloma), de una pérdida de sangre o de ciertos trastornos hemolíticos compensados. También pueden ser normocrómicas-normocíticas la carencia de hierro en fase inicial y la anemia de enfermedad crónica. En nuestro medio es posible observar anemias dimórficas (microcíticas y macrocíticas) de carácter nutricional. El resultado puede ser una anemia normocrómica-normocítica.

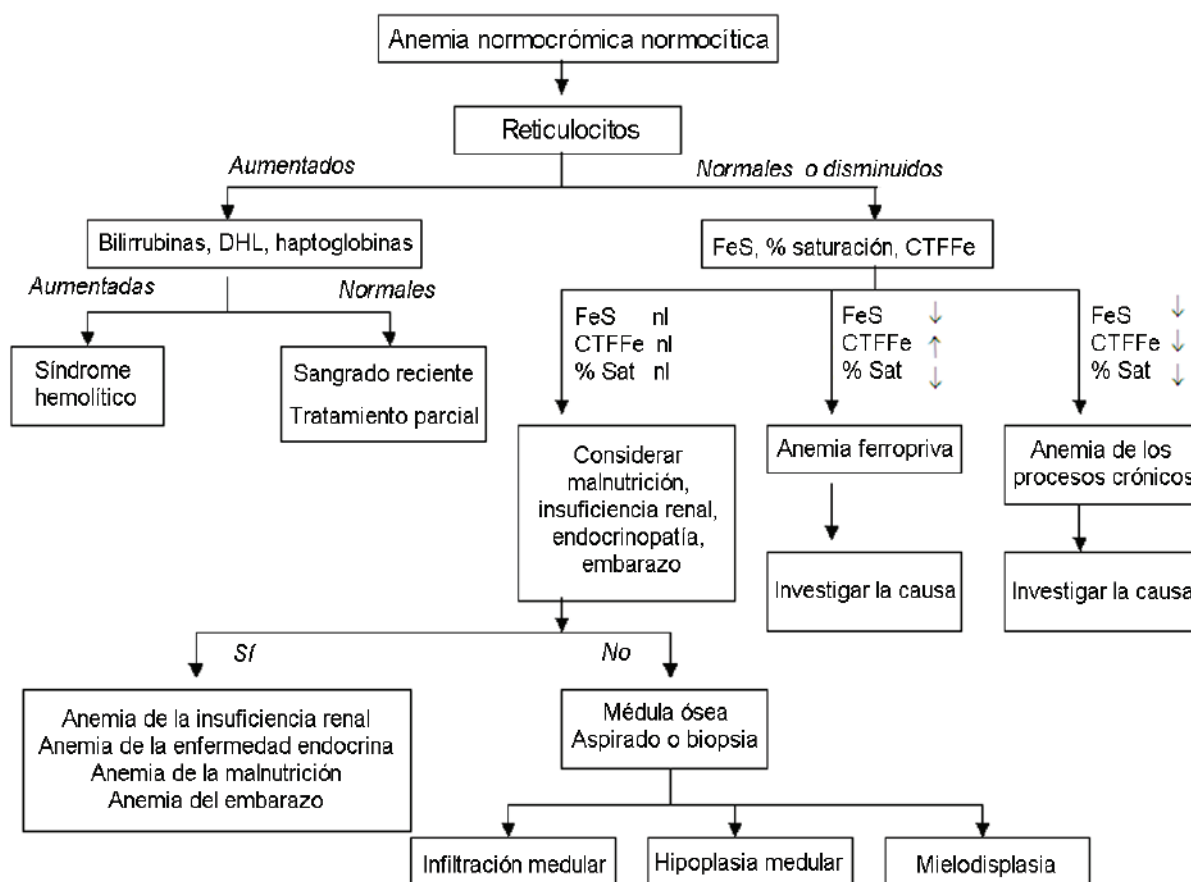


Figura N° 3. Flujograma para el diagnóstico de las anemias normocrómicas-normocíticas.

Anemia hipocrómica-microcítica

Es la anemia que se presenta con cifras de VCM menores de 80 μ l y una HCM inferior de 27 pg.

La anemia hipocrómica-microcítica está representada por la deficiencia de hierro, la intoxicación crónica por

plomo, los síndromes talasémicos, la anemia sideroblástica y algunos casos de anemia por enfermedad crónica.

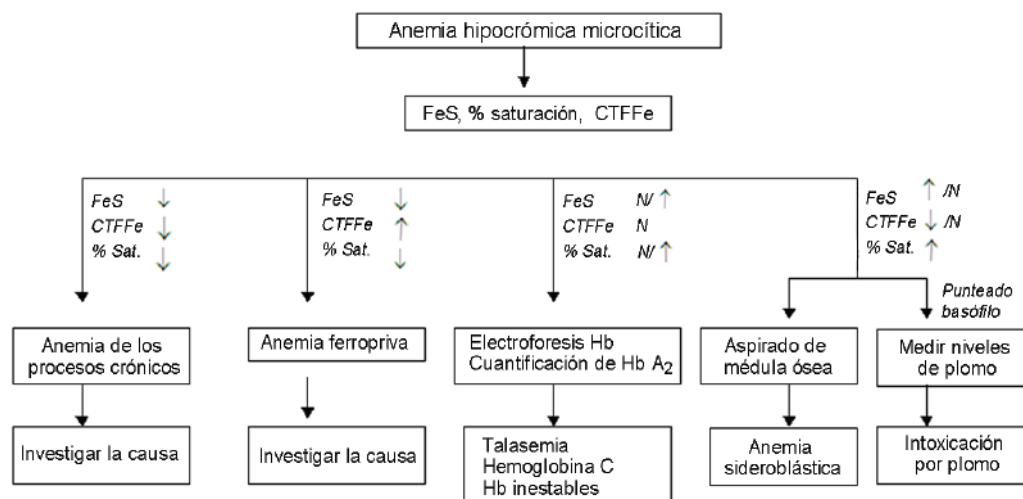


Figura N° 4. Flujograma para el diagnóstico de las anemias hipocrómicas-microcíticas.

Anemia macrocítica (normocrómica)

Una anemia se clasifica como macrocítica cuando su VCM es mayor de 100 fl, su CHCM mayor de 33 g/dl y el HCM superior a 22 pg.

Este grupo comprende anemias regenerativas, con reticulocitosis significativa, y anemias arregenerativas, típicamente las megaloblásticas, las no megaloblásticas y las falsas macrocíticas.

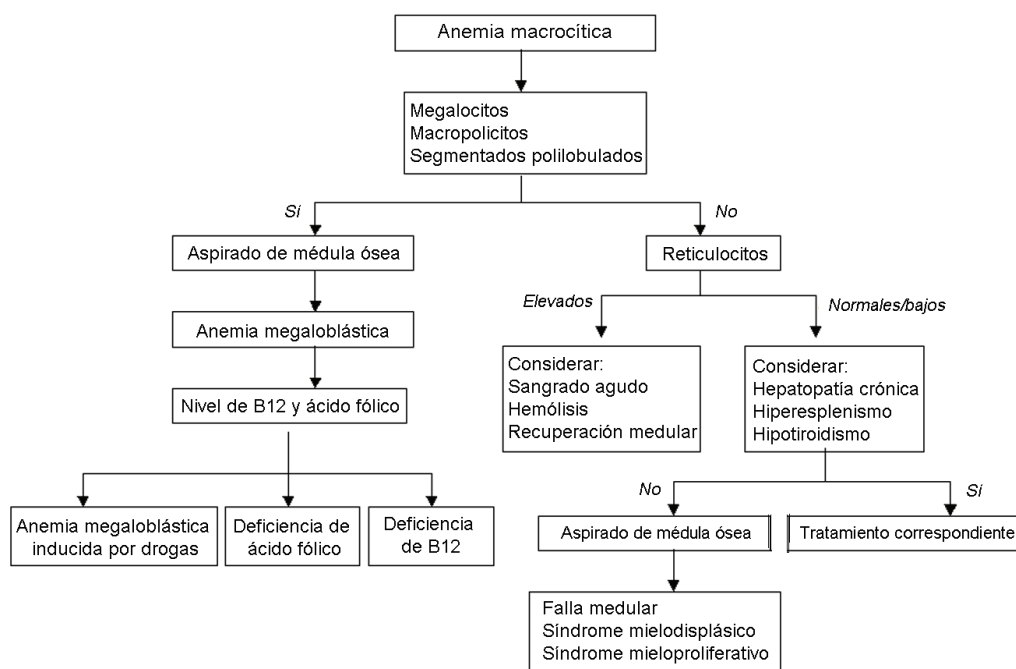


Figura N° 5. Flujograma para el diagnóstico de las anemias macrocíticas.

En general, frente a un cuadro de anemia se deben plantear las siguientes interrogantes:

1. ¿Tiene anemia el paciente?
2. ¿Cuáles son las características morfológicas de la anemia?
3. ¿Cuál es el mecanismo de producción de la anemia?
4. ¿Cuál es la causa o enfermedad de base que es responsable del mecanismo anormal?
5. ¿Cuál es la mejor forma de tratamiento?

Una evaluación orientada del paciente anémico suministra información precisa y facilita el abordaje de la patología con mayor eficiencia, lo que conduce a un diagnóstico rápido y certero.

BIBLIOGRAFÍA

- Beck W. Hematology. 2 ed. Massachusetts: MIT Press; 1977.
- Cartín W. El reticulocito y sus índices (revisión). Rev Col MQC 2007; 13(2): 25-31.
- Celle P, Lichtman MA. Anemia con reticulocitosis: trastornos hemolíticos. En: Hematología clínica. Lichtman M.A. México: Editorial Interamericana; 1983. p. 51-57.
- Dorantes-Mesa S. Diagnóstico de los problemas hematológicos en Pediatría. 2 ed. México: Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México; 1997.
- Elizondo J, Sáenz GF, Páez A. Tratado diagnóstico en el estudio de las anemias. San José, Costa Rica: Hospital San Juan de Dios, Caja Costarricense de Seguro Social; 1979.
- Erslev AJ, Gabuzda TG. Hematología. Aspectos fisiopatológicos. 2 ed. México: Interamericana; 1981.
- Hoffbrand VH, Catovsky D, Tuddenham EGD. Postgraduate hematology. 5 ed. Malden MA: Blackwell Publishing; 2005.
- Kelleher JF. Anemia infancy and childhood. Prim Care 1980; 7(3): 473-487.
- Leavell BS, Thorup OA. Fundamentals of clinical hematology. 3 ed. Philadelphia: W.B. Saunders, Co.; 1971.
- Lichtman M, Beutler E, Kaushansky K, Kipps TJ, Seligsohn U, Prchal J. Williams Hematology. 7 ed. New York: McGraw-Hill Professional; 2005.
- Parsons RL, Fry J. Anemia 1: diagnosis and investigation. Therapeutics in general practice. 1978. p. 599.
- Sans-Sabrafen J, Besses-Raebel C, Vives Corrons JL. Hematología clínica. 5 ed. España: Editorial Elsevier; 2006.
- Sills RH. Practical algorithms in pediatric hematology and oncology. Switzerland: Editorial Karger; 2003.
- Vives-Corrons JL. Introducción al estudio de las anemias. Clasificación clínica y medidas terapéuticas generales. En: Sans-Sabrafen J. Hematología clínica. Barcelona: Doyma S.A.; 1982. p. 181-297.
- Ward PC. Investigation of microcytic anemia. Postgrad Med 1979; 65(1): 235-240, 242.
- Williams WJ, Beutler E, Erslev AJ, Lichtman M. Hematology. 3 ed. New York: McGraw-Hill Book Co.; 1983.
- Wintrobe MM. Clinical Hematology. 7 ed. Philadelphia: Lea Febiger; 1976.

4

METABOLISMO DEL HIERRO Y ANEMIA POR DEFICIENCIA DE HIERRO

Dr. Luis A. Mora Bermúdez
Dra. Berta E. Valverde Rojas

GENERALIDADES

El hierro (Fe) es un metal de transición presente en todas las células de los mamíferos, y es indispensable para el funcionamiento normal del organismo humano. Sus principales funciones incluyen la unión y la liberación de oxígeno (formando parte del heme en la hemoglobina y la mioglobina), así como la participación en el metabolismo celular, como es el caso de las enzimas que intervienen en los procesos de óxido-reducción: citocromos, catalasas, peroxidases, deshidrogenasas, reductasas, entre otras. Aproximadamente la mitad de las enzimas y cofactores del ciclo de Krebs contienen Fe o lo necesitan para su acción. En condiciones fisiológicas el Fe siempre está unido a una proteína, pues en forma libre causa daño tisular, promoviendo la formación de radicales de oxígeno que atacan lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. En los mamíferos esa proteína está representada por la transferrina, que lo une con gran afinidad y lo transporta por todo el organismo.

ASPECTOS NUTRICIONALES Y METABÓLICOS

Aunque el Fe es uno de los elementos más abundantes en la tierra, su deficiencia (ferropenia) es frecuente en todos los países, independientemente de su condición socioeconómica, afectando a cerca de 500 millones de personas alrededor del mundo. Esto se debe, en términos muy generales, a que el organismo humano tiene una habilidad limitada para absorberlo y es frecuente la pérdida excesiva como consecuencia de hemorragias.

Su deficiencia es la causa más común de anemia y por tanto, de anemia microcítica-hipocrómica, en la cual los índices eritrocitarios VCM y HCM están disminuidos y el frotis de sangre periférica muestra glóbulos rojos pequeños (microcitos) y pálidos (hipocrómicos). Esta apariencia es causada por un defecto en la formación de la Hb.

La limitación o alteración en cualquiera de los siguientes componentes desencadenará una alteración en su síntesis:

Fe + protoporfirina IX-----► HEME+GLOBINA (cadenas)-----► HEMOGLOBINA

Distribución en el adulto (Cuadro N° 1)

El contenido total de Fe en un hombre adulto de 70 kg es de 3,5 g (50 mg/kg) y en una mujer adulta de 60 kg es de 2,1 g (35 mg/kg). El Fe de la Hb constituye la mayor parte del Fe del organismo. En general, 1 g de Hb contiene 3,4 mg de Fe; así, un varón de 70 kg de peso, con Hb de 15 g/dl y un volumen sanguíneo de

5.000 ml, tendrá 2.500 mg de Fe hemoglobínico. Esta sencilla consideración (100 ml de sangre contienen 50 mg de Fe) aporta información muy útil para cuantificar tanto la pérdida de Fe en hemorragias, como la ganancia de este en caso de transfusiones de sangre total o eritrocitos, que con frecuencia pueden llevar a hemocromatosis iatrogénica en el paciente politransfundido.

Cuadro N° 1. Distribución corporal de Fe en la persona adulta

	% del total	Hombres (g)	Mujeres (g)
Hemoglobina	65	2,4	1,7
Depósito (ferritina y hemosiderina)	30	1,0	0,3
Mioglobina	3,5	0,15	0,12

Cuadro N° 1. Distribución corporal de Fe en la persona adulta

Enzimas con heme	0,5	0,02	0,015
Hierro unido a transferrina	0,1	0,04	0,03

CONTENIDO EN LA DIETA

El Fe puede ingerirse de dos formas: orgánico, constituido por proteínas con Fe y complejos proteínas-heme; o inorgánico, obtenido primariamente de fuentes no animales. Tanto su contenido como la proporción que se absorbe de este, difiere de alimento a alimento. En general, las carnes, en particular el hígado, son mejores fuentes que los vegetales, huevos y derivados lácteos. De hecho, la carne roja es la mejor fuente de Fe orgánico e inorgánico. Los vegetales solo contienen Fe inorgánico, el cual puede formar parte de hidróxidos o estar unido a moléculas orgánicas, como azúcares, aminoácidos, lactato, citrato y otras.

En promedio, la dieta diaria de los países occidentales contiene de 10 a 15 mg de Fe, de los cuales, en condiciones normales, se absorbe solamente la cantidad necesaria para compensar las pérdidas diarias: 0,6 a 2 mg. Esta proporción puede aumentarse en condiciones de máxima avidez; por ejemplo, en deficiencia de Fe o embarazo se absorbe entre un 20 y un 30%, es decir, de 3 a 4 mg.

Absorción

La cantidad de Fe extraída de la dieta es pequeña y la regulación de la absorción intestinal de este elemento

es crítica, debido a que el ser humano no tiene otras vías fisiológicas cuantitativamente importantes para su excreción. El Fe tiene que pasar por el lumen intestinal a través de las membranas apical y basolateral del enterocito, para llegar al plasma. Por otro lado, la mayor parte del Fe de la dieta no se halla fácilmente disponible para la absorción. Los sitios especializados para máxima absorción fisiológica son el duodeno y la porción alta del yeyuno.

El grado de absorción del Fe inorgánico de los alimentos es variable y depende de su contenido, así como del Fe total del organismo y de la presencia de reguladores que favorecen o desfavorecen su absorción (Cuadro N° 2). Paradójicamente, algunos alimentos ricos en Fe son fuentes pobres de este mineral; tal es el caso de las espinacas, que contienen a la vez cantidades considerables de oxalatos, los cuales forman complejos inabsorbibles con el Fe. Para que se absorba debe encontrarse de preferencia en estado reducido (Fe^{+2}); esto se logra gracias al HCl del jugo gástrico que transforma el Fe^{+3} en Fe^{+2} ; función que también realizan agentes reductores, como el ácido ascórbico, la cisteína, la fructosa y otros ácidos débiles. El Fe orgánico es absorbido parcialmente como heme y otra porción es rota y transformada en Fe inorgánico.

Cuadro N° 2. Factores que afectan la absorción del hierro

Favorecen	Desfavorecen
•γ Ácidos (HCl, ascórbico, cítrico y málico). •γ Solubilizantes (azúcares, aminoácidos). •γ Forma ferrosa (Fe^{+2}). •γ Heme. •γ Ferropenia. •γ Eritropoyesis ineficaz. •γ Embarazo. •γ Hemocromatosis hereditaria. •γ Aumento de expresión de DMT-1 y ferroportina en enterocitos duodenales.	•γ Álcalis (antiácidos, secreción pancreática). •γ Precipitantes: fitatos (maíz, trigo, arroz) y fosfatos (leche). •γ Forma férrica (Fe^{+3}). •γ Exceso de Fe. •γ Eritropoyesis disminuida. •γ Infección o inflamación crónica. •γ Tanatos (té, café, leguminosas). •γ Oxalatos (espinaca, tomate). •γ Disminución de la expresión de DMT-1 y ferroportina en enterocitos duodenales. •γ Aumento de hepcidina.

Regulación de la absorción del hierro

Las células que absorben Fe en el epitelio duodenal se originan en las criptas intestinales y migran hacia la superficie de las vellosidades conforme se diferencian. La absorción es regulada por al menos tres mecanismos independientes:

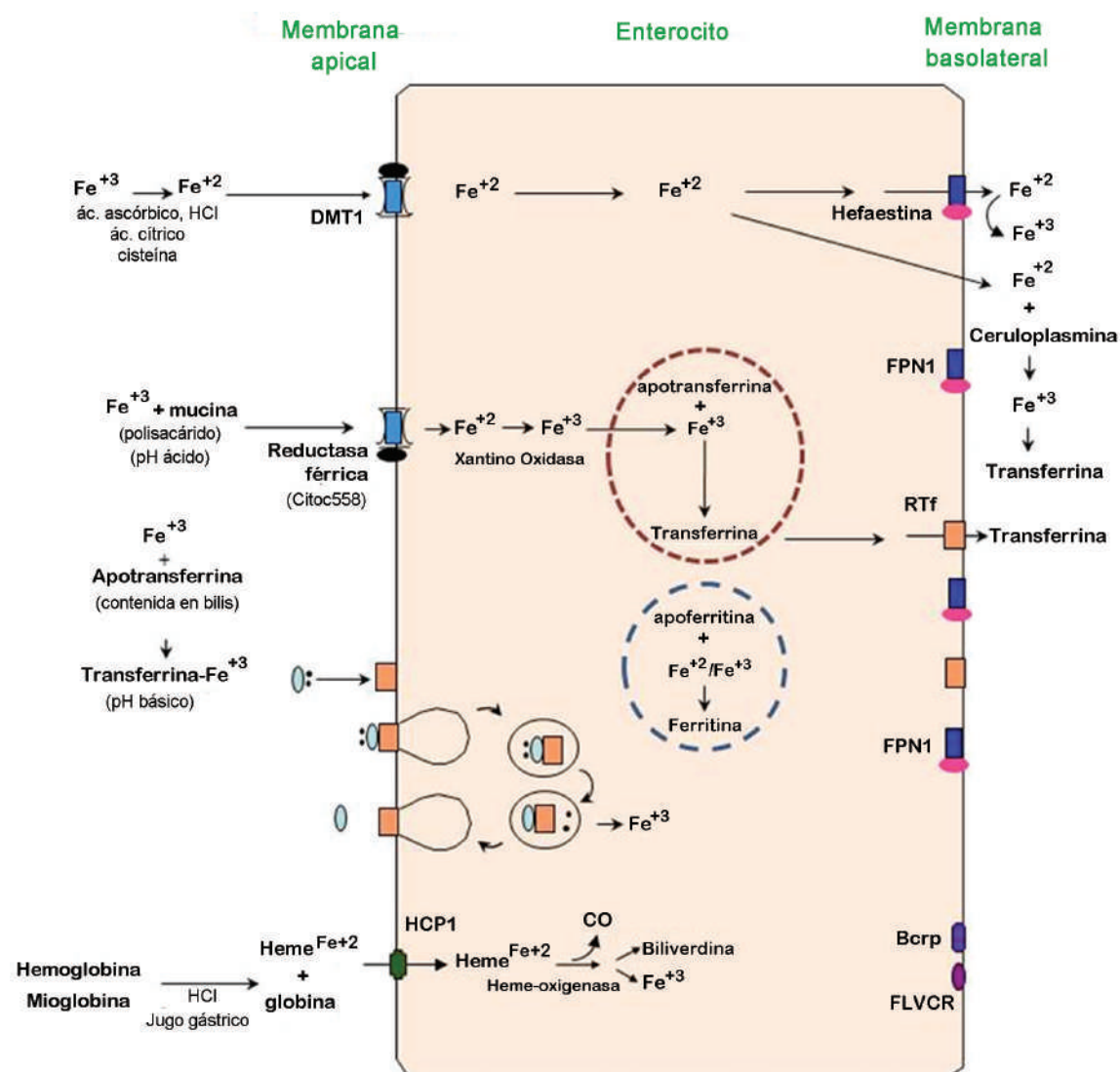
- 1) El Fe ingerido en la dieta.
- 2) La cantidad de depósitos de hierro del organismo.
- 3) El estado de la eritropoyesis de la médula ósea.

Vías de absorción de hierro

Las principales vías de absorción son las siguientes:

• γ Absorción por medio de proteínas DMT1 (Figura N° 1)

Las criptas duodenales detectan los requerimientos de hierro del organismo, dependiendo del estado corporal de Fe, y están programadas con esta información al transformarse en enterocitos absorptivos. Los enterocitos revisten los vellos absorbentes cercanos a la unión gastroduodenal y son responsables de toda la absorción de hierro. A pH menor de 3, el Fe^{+3} es relativamente estable y se une a la mucina que lo transfiere al receptor DMT1 (transportador de metales divalentes), también conocido como DCT1 o Nramp2. La absorción del Fe depende de los niveles de DMT1 presentes en el enterocito.



FPN1: ferroportina; Bcrp: Breast cancer resistance protein; FLVCR: feline leukemia virus subgroup C receptor; RTf: receptor de transferrina; DMT1: transportador de metales divalentes; HCP1: heme carrier protein.

Figura N° 1. Absorción del hierro a través del enterocito.

Estas integrinas son proteínas que atraviesan la capa bilipídica de la membrana apical de los enterocitos, mediante las cuales pasa el Fe al interior de la célula. Una reductasa férrica, la citocromo reductasa (Citoc558), presente en la superficie apical, se encarga de convertir el Fe^{+3} en Fe^{+2} , y de esta manera pasa al interior del enterocito.

Por otro lado, la ferroportina (FPN1 o IREG1), localizada en la membrana basolateral del enterocito, funciona como un exportador de Fe^{+2} , regulando su salida hacia la circulación portal. La FPN actúa conjuntamente con la hephaestina, una proteína con cobre que actúa como ferroxidasa intestinal, transformando el Fe^{+2} en Fe^{+3} , antes de que se una a la transferrina plasmática. Un mecanismo de regulación se da a este nivel cuando la hepcidina, un polipéptido producido en el hígado y considerado actualmente como el mayor regulador hormonal de la homeostasis del hierro, inhibe la salida del Fe de los macrófagos, las células epiteliales intestinales y los sincitiotrofoblastos placentarios, al interactuar con la FPN1 y acelerando la degradación de su ARNm. De este modo, bajos niveles de hepcidina en deficiencia de hierro, aumentan la cantidad de FPN1 y provocan que entre más Fe al plasma y se pierda menos Fe cuando la célula duodenal se descame desde el ápex de la vellosidad hacia el lumen. La acción de la hepcidina de impedir la salida del Fe del sistema monocítico macrofágico (SMM), la convierte en un elemento muy importante en la fisiopatología de la anemia de la enfermedad crónica.

• **Absorción a través de receptores del heme**

Cuando la dieta contiene carne o vísceras, el grupo heme es liberado de la hemoglobina o de la mioglobina por acción del HCl y de las proteasas digestivas. El heme se absorbe por medio de un receptor específico, llamado proteína transportadora del heme o HCP-1; este proceso es dependiente de energía. El HCP-1 es el primer transportador descrito en los mamíferos que introduce heme a las células y está expuesto en la membrana apical del enterocito duodenal. Una vez dentro de la célula, el heme es metabolizado por la hemoxigenasa, y ya libre el Fe, sigue los mismos caminos del Fe inorgánico. Sin embargo, permanece incierto si todo el heme es degradado en la célula epitelial intestinal o si cierta cantidad puede atravesar intacta la célula. Si el heme intacto es exportado del enterocito, lo haría a través de dos exportadores, que son el Bcrp y el FLVCR. Si esto ocurre, el subsecuente destino del heme en el plasma es desconocido. En todo caso, el Fe-heme tarda más tiempo que el inorgánico en ser liberado y enviado al torrente sanguíneo.

• **Absorción a través de los receptores de transferrina (TfR)**

Los receptores de transferrina se encuentran en la membrana apical de las células de la mucosa intestinal. En este caso, el Fe^{+3} se une a la transferrina (Tf), y este complejo se une a los receptores de la mucosa; el complejo Fe-Tf-receptor es internalizado en la célula por medio de una vesícula endocítica. Luego, el Fe se disocia del complejo receptor-transferrina como resultado de una disminución en el pH del endosoma. El Fe es liberado en el citoplasma y el complejo receptor-apotransferrina (transferrina sin moléculas de hierro) regresa al exterior de la célula, donde es liberada para reiniciar el mismo ciclo.

Por otro lado, cabe señalar que dentro del enterocito también hay apotransferrina disponible para capturar moléculas de Fe^{+3} , que luego son transportadas vía TfR al exterior de la célula.

• **Absorción pasiva**

Fisiológica y cuantitativamente no es importante y depende en forma exclusiva de la concentración de Fe^{+2} en el lumen intestinal.

• **Sistema IRE/IRP (Figura N° 2)**

Todos los procesos de regulación de la homeostasis del hierro mantienen el balance coordinado entre la captación, la utilización y el almacenamiento intracelular. Esto se da mediante la expresión de proteínas postranscripcionales, que son reguladas según el nivel intracelular del metal. Este mecanismo está mediado por interacciones específicas entre las secuencias IRE (elementos respuesta del hierro), localizadas en los ARNm correspondientes a las proteínas involucradas con la absorción, y las proteínas citoplasmáticas denominadas IRP (proteínas reguladoras del hierro). Las secuencias IRE forman una estructura secundaria en forma de lazo (*loop*), lo cual le permite interactuar con las IRP. Las secuencias IRE se ubican en las regiones no codificantes situadas en los extremos 5' o 3' de los ARNm; dependiendo de la posición de estas secuencias, así será el efecto que ocasionará su interacción con las IRP. Las IRE situadas en la región 5' actúan regulando la unión del mensajero al ribosoma, es decir, controlando el inicio de la traducción, mientras que las situadas en la región 3' estabilizan o degradan el ARNm, por acción de endorribonucleasas, impidiendo la síntesis de la proteína involucrada.

Se han identificado dos proteínas IRP (IRP1 e IRP2) que actúan como sensores del contenido celular del hierro. En la región 3' del ARNm del TfR, hay cinco

secuencias IRE altamente conservadas. En este caso, la interacción IRE-IRP protege al mensajero de la degradación, permitiendo, de esta manera, su traducción con la consecuente síntesis del receptor. La región 5' de los ARNm de las cadenas liviana y pesada de la ferritina y de la enzima involucrada con la síntesis del anillo pirrólico del heme, la delta-aminolevulinato sintetasa (ALAS), contienen una única secuencia IRE. En ambos casos, la interacción de las IRP con esta secuencia bloquea la traducción. De esta forma, el sistema IRE-IRP le permite a las células regular en forma coordinada la biosíntesis de las proteínas involucradas en la captación (TfR), utilización (ALAS) y almacenamiento (ferritina) de hierro, durante las variaciones fisiológicas de su biodisponibilidad.

En un estado de depleción de hierro, el objetivo de la célula es incrementar la captación del metal y disminuir su almacenamiento. Las IRP activas se unen a las secuencias IRE en 3', aumentando la síntesis

de TfR, DMT y FPN, mientras que disminuyen la de ferritina y la de ALAS. Esto conlleva a un incremento en el paso de Fe desde el lumen hacia el enterocito, en un lapso de tiempo de 24 a 48 horas, cuando el enterocito alcanza la superficie absorbente apical de las vellosidades duodenales. Concomitantemente, se aumenta la síntesis de apotransferrina en la célula absorbente, de manera que capta al Fe recién ingresado, formando transferrina, que actúa como facilitador para la exportación del Fe hacia el plasma y el resto de la economía.

De manera inversa, cuando los niveles de hierro son altos, las IRP se disocian de las IRE, y como consecuencia, el ARNm de TfR y DMT es degradado, disminuyendo su síntesis, mientras se incrementa la síntesis de ferritina y de ALAS. De esta forma, el metal es almacenado como ferritina y eliminado con la descamación del epitelio intestinal, que se recambia cada tres días.

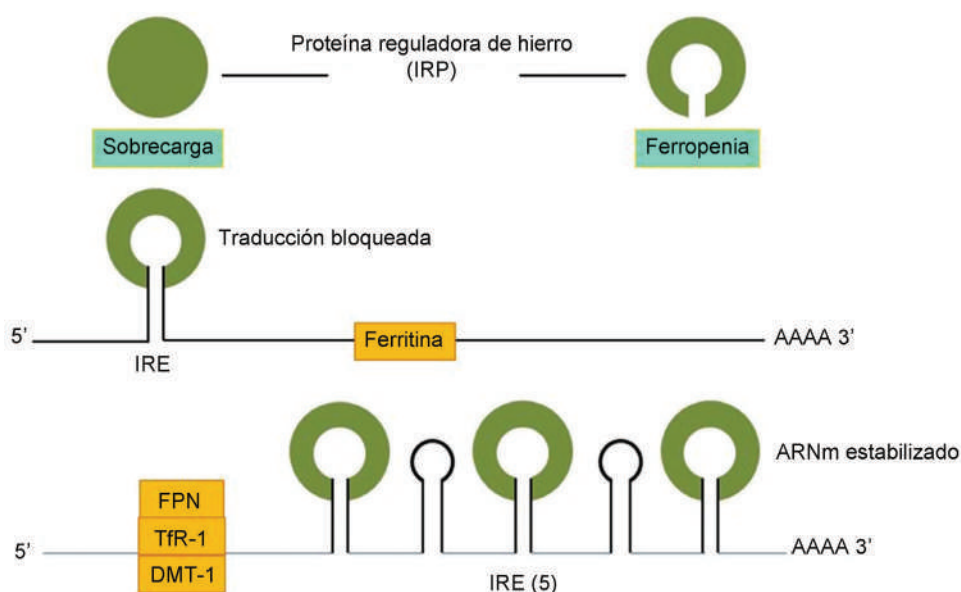


Figura N° 2. Sistema IRE/IRP. (Adaptado de: Hoffbrand V, Chaim H, Camaschella C. Iron metabolism, iron deficiency of haem synthesis; 2011).

Pérdidas de hierro

El organismo normalmente conserva el Fe en forma tan eficiente, que la pérdida diaria por heces, orina, sudor, uñas y pelo, es compensada con una dieta adecuada. La pérdida fisiológica es de 1 mg en el hombre adulto; 2 mg en la mujer premenopáusica; 3,5 mg en la mujer embarazada y 1 mg en la lactancia. Solamente se pierden cantidades importantes de Fe en caso de

hemorragias; con cada menstruación las mujeres en edad reproductiva pierden aproximadamente 45 ml de sangre, lo que explica que pierdan el doble del Fe que pierden los varones.

Transporte del hierro: la transferrina o siderofilina

El transporte del hierro se realiza primordialmente por la proteína llamada transferrina, con la colaboración

de los receptores de transferrina (TfR-1), que se encuentran en todas las células del organismo humano y en grandes cantidades en los precursores eritroides, reticulocitos, sincitiotrofoblastos (placenta) y en células tumorales. El TfR-1 es una glicoproteína de 180 Kd, con dos subunidades idénticas (homodímero). Cada homodímero une dos moléculas de Tf.

La transferrina es una betaglobulina, con peso molecular de 88 Kd, que tiene dos sitios para unir Fe^{+3} con una alta afinidad. Incorpora el Fe soluble, previene su precipitación y evita que reaccione con otras moléculas, por lo que atenúa su actividad redox y participa en la cesión del Fe, uniéndose a los TfR-1 presentes en la superficie de todas las células. Se sintetiza en hígado, bazo y gónadas; se secreta en bilis, tiene una vida media de 10 días y es reutilizable. Está saturada normalmente a un tercio de su capacidad, lo que nos da una idea clara de su gran potencial de transporte. La saturación de la Tf depende del hierro presente en los tejidos que lo aportan (mucosa intestinal, SMM y parénquima). Cuando la apotransferrina transporta un átomo de Fe se le llama monoférrica y cuando está saturada con dos átomos se denomina diférrica; el Fe de esta última es captado más rápidamente por los eritroblastos, reticulocitos y placenta.

Transferencia del hierro (Figura N° 3)

La Tf se encarga de transportar el Fe del plasma a los tejidos y a los sitios de reserva. Desde luego, su función es trascendental en las células que tienen gran avidez de incorporar Fe, como son los eritroblastos,

los reticulocitos y la placenta. El mecanismo prototipo (endocitosis) de cesión de Fe a las células, por el que se transfiere el 95% del metal a los eritroblastos, es el siguiente: la Tf cargada con Fe se une a los RTf de la superficie de los eritroblastos; cuando esto sucede, la interacción ligando-receptor origina una invaginación mediada por la clatrina, en la membrana celular, y la posterior formación de endosomas intracelulares que contienen el complejo Tf-RTf. El pH dentro de los endosomas es rápidamente disminuido por la bomba de protones, lo que produce cambios conformacionales en ambas proteínas (Tf y RTf). El Fe es liberado del complejo y reducido a Fe^{+2} ; de esta forma, es transportado a través de la membrana endosomal por el DMT1 hacia el citosol; la mayoría va a la mitocondria para unirse a la protoporfirina IX y formar el grupo heme. Mientras tanto, los endosomas que contienen Tf-RTf retornan dichas proteínas a la superficie celular para ser reutilizadas. En las células no eritroides el Fe se guarda como ferritina y hemosiderina, igual que como se almacena en el eritroblasto el Fe que no se usa para la síntesis del heme.

Los eritroblastos también pueden obtener Fe directamente de la ferritina de las células del SMM por micropinocitosis (rofeocitosis o fenómeno de Bessis), pero en la actualidad se considera que esta vía no tiene significado fisiológico. Del hierro de la transferrina, un 80% a 90% va a los eritroblastos, un 10% a 20% al hígado y a otros tejidos, y una pequeña cantidad va al músculo esquelético y al epitelio intestinal.

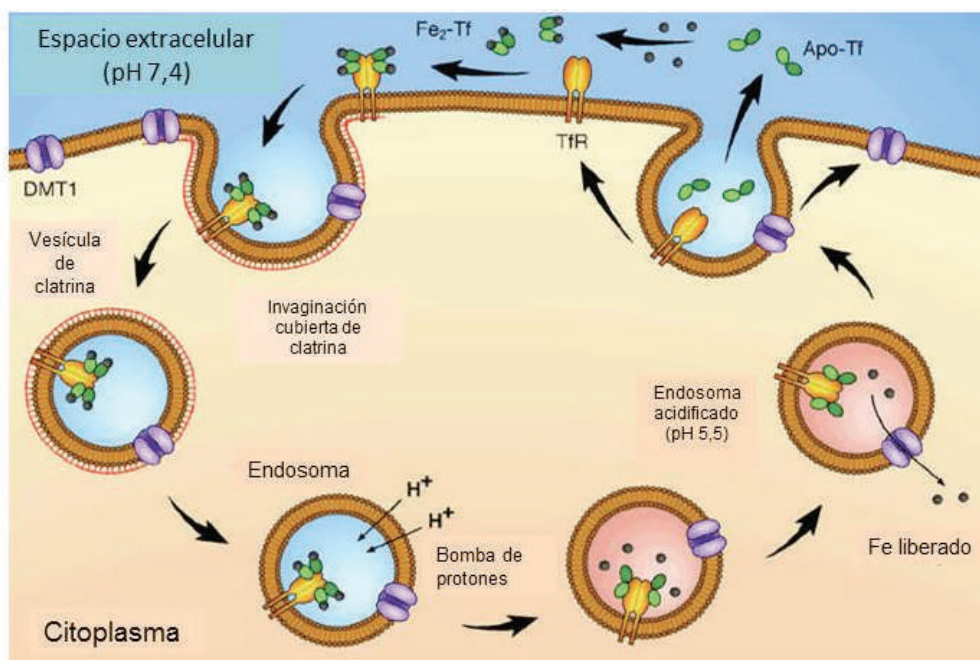


Figura N° 3. Transferencia de hierro a las células.

Hierro en el eritroblasto

En casos de alteración en la síntesis del heme, como en la intoxicación por plomo o en anemias sideroblásticas, la mitocondria acumula cantidades excesivas de hierro en agregados amorfos, que dan origen a los sideroblastos anulares (eritroblastos con hierro alrededor del núcleo), los cuales se evidencian por la reacción de azul de Prusia. Por el contrario, los gránulos sideróticos normales son agregados de ferritina que se localizan en organelas lisosomales y no en las mitocondrias, y se observan como gránulos pequeños de color azul, de uno a tres, en el 20 - 50% de los eritroblastos.

En la deficiencia de hierro y en las anemias de la enfermedad crónica, prácticamente no se observan sideroblastos en médula ósea (MO), a diferencia de lo que sucede en casos de sobrecarga de hierro, en donde son muy numerosos.

Papel del sistema monocítico macrofágico (SMM)

Los macrófagos tisulares reconocen a los eritrocitos viejos o dañados y los fagocitan para removerlos de la circulación; además, los lisan y degradan la hemoglobina. La heme-oxigenasa cataliza la liberación del Fe del heme y aunque el movimiento del Fe dentro de la célula no está muy claro, es probable que los macrófagos liberen el Fe a través de la FPN1 (con la ayuda de la ferrioxidasas ceruloplasmina). El 80% de este Fe es utilizado en la síntesis de hemoglobina (Hb) y el 20% restante, que proviene del recambio de los depósitos y de la dieta, es decir, de la degradación de la Hb, permanece en las células del SMM como ferritina y hemosiderina.

Diariamente se destruye 1/120 parte de 5.000 ml (volumen sanguíneo de un adulto), lo que equivale a 42 ml de sangre; por lo que cada día se requieren alrededor de 21 mg de Fe para la formación de nueva Hb. A partir de aquí se comprende de manera clara que es imposible suplir dicha demanda con el Fe que se absorbe a diario. De lo anterior también se desprende que la mayoría del Fe que transporta la Tf proviene de la hemocateresis (destrucción de eritrocitos) y solo una pequeña fracción la obtiene del enterocito.

Hierro de depósito

El hierro de depósito se encuentra en dos formas: ferritina y hemosiderina.

La ferritina (Ft)

Es soluble en agua y está formada por una proteína

llamada apoferritina, que es una proteína esférica de 440 Kd, constituida por 24 monómeros, que dejan seis poros a través de los cuales penetra el Fe a su interior. Cada molécula de Ft acumula en su interior de 2.000 a 5.000 átomos de Fe, como hidróxido fosfato férrico. La captación y liberación del Fe por la Ft es muy rápida; su liberación parece estar mediada por pequeñas sustancias reductoras, capaces de atravesar sus poros, de solo 10 Å, como el ácido ascórbico, los mononucleótidos de flavina reducidos y otras sustancias.

La Ft se encuentra en pequeñas concentraciones en prácticamente todas las células del organismo y también en el plasma, y su presencia es muy importante porque se correlaciona con los depósitos totales de Fe del organismo. Los hepatocitos y tal vez otras células, tienen receptores de Ft, a través de los cuales la captan del plasma o fluidos intersticiales y la internalizan.

La hemosiderina

Está básicamente en células del SMM de MO, hígado (Kupffer) y bazo. Es insoluble en agua. Formada por agregados de Ft parcialmente desnaturizada y desproteinizada. Un 25 a 30% de su peso está constituido por Fe. Para demostrarla en SMM se utiliza la tinción del azul de Prusia.

HEMOCROMATOSIS

En sentido estricto, el término hemocromatosis denota el trastorno producido por la acumulación patológica de Fe en el organismo. Sin embargo, en la práctica clínica se reserva para denotar las situaciones en las que la acumulación de Fe se debe a un trastorno congénito de su metabolismo (hemocromatosis hereditaria, HH).

La acumulación de Fe también puede ser secundaria a otras causas, en cuyo caso se denomina sobrecarga férrica secundaria; tal es el caso de los pacientes politransfundidos. Al respecto se debe recordar que por cada 500 ml de sangre, se introducen en promedio 250 mg de Fe.

Hemocromatosis hereditaria (HH)

La hemocromatosis hereditaria (HH) es un síndrome caracterizado por absorción intestinal excesiva de Fe, que implica un estado progresivo de sobrecarga en distintos órganos, especialmente en hígado, corazón, páncreas y otros sitios endocrinos, produciendo deterioro anatómico y funcional multiorgánico, incluyendo cirrosis, insuficiencia cardíaca, diabetes y excesiva pigmentación de la piel.

La HH puede clasificarse en:

- a. Tipo I, relacionada con la mutación del gen HFE:** localizado en el brazo corto del cromosoma 6. Constituye el 90% de todos los casos. A su vez, el 95% de dichos casos tienen una mutación homocigota del gen HFE, subtipo C282Y; el 5% restante lo constituye la mutación heterocigota H63D/C282Y. Su función se centra en la regulación de la síntesis de hepcidina; de ahí que una alteración estructural provocará disminución de hepcidina, con la consecuente sobreexpresión de FPN, lo cual representa un aumento descontrolado en la absorción del hierro.
- b. HH no relacionada con el gen HFE (tipos II a V):** constituye el 10% de todos los casos. Aquí la excesiva absorción intestinal de Fe es causada por mutaciones de otros genes, como el de la ferroportina (FPN), la hemojuvelina (HJV), la hepcidina (HAMP) o del receptor 2 de la transferrina (TfR2), lo cual producirá disminución en la producción de HAMP y como consecuencia, liberación inadecuada de Fe de los macrófagos y enterocitos al plasma. En la mayor parte de los casos se transmite por herencia autosómica recesiva y se caracteriza por presentar niveles bajos de hepcidina urinaria y plasmática. Ciertas causas misceláneas muy raras de HH son: mutación del gen DMT1, atranferrinemia congénita y aceruloplasminemia hereditaria.

El diagnóstico de HH se basa en demostrar la existencia de sobrecarga de Fe tanto en sangre como

en los órganos (manifestación fenotípica). Un índice de saturación de la Tf (IS) >45% es el marcador fenotípico más precoz de HH, precediendo a la elevación de la Ft y de las transaminasas. Se debe tomar en cuenta que la Ft tiene una tasa elevada de falsos positivos, ya que se incrementa en enfermedades crónicas inflamatorias o neoplásicas y en hepatopatías.

La valoración fenotípica está indicada en sujetos pertenecientes a grupos de alto riesgo de padecer HH. Cuando hay alteración fenotípica se debe realizar un estudio de los marcadores genotípicos descritos. Desde que se dispone del análisis genético de la mutación HFE, la biopsia hepática tiene un papel secundario en el diagnóstico. En la actualidad, la resonancia magnética es el mejor método diagnóstico no invasivo para HH.

El tratamiento de elección son las flebotomías y algunas medidas dietéticas. Se recomienda el uso de quelantes cuando las flebotomías no se toleran o están contraindicadas, como en insuficiencia cardíaca o anemia.

ANEMIA POR DEFICIENCIA DE HIERRO (ADH)

La deficiencia de hierro (DH) se produce cuando hay un balance negativo de Fe en el organismo; es de instauración crónica y pasa por las siguientes etapas: prelatente, latente y anemia por deficiencia de hierro (ADH); en las que se dan, en resumen y con referencia a parámetros de laboratorio, una serie de cambios, los cuales se muestran en el Cuadro N° 3.

Cuadro N° 3. Etapas en el desarrollo de la deficiencia de hierro			
Etapas	Prelatente	Latente	ADH
Hemosiderina en MO	↓	Ausente	Ausente
Ferritina sérica	↓	↓↓	↓↓
FeS	NI o lig. ↓	↓	↓↓
CTFFe	NI o lig. ↑	↑	↑
IS	20-50% (NI)	<16%	<10%
Hb	NI	(<20% del NI)	(<20% del NI)
VCM y HCM	Nls	↓	↓↓
Morfol. eritrocítica	Normocítica-normocrómica	N-N	Microcítica-hipocrómica

FeS: hierro sérico; CTF: capacidad total de fijación; IS: índice de saturación.

La ADH afecta aproximadamente al 30% de la población mundial y cerca del 43% de los niños preescolares, 51% de las mujeres embarazadas y 37% de los menores en edad escolar, según datos de la OMS.

La ADH es la anemia nutricional más frecuente en todo el mundo, y en países en vías de desarrollo constituye el segundo problema de salud pública. Afecta a personas de todas las edades y grupos económicos, aunque es más común en niños, en personas con dietas pobres en carne y en mujeres.

Causas de la deficiencia de hierro

La pérdida crónica de sangre, especialmente uterina o del tracto gastrointestinal, es la principal causa de deficiencia de hierro en adultos. Debe recordarse que medio litro de sangre total contiene alrededor de 250 mg de Fe y que a pesar de un incremento en la absorción de Fe alimentario en una etapa temprana de la ADH, es usual un balance negativo de Fe en pacientes con sangrado crónico.

El aumento en las demandas de Fe durante la infancia, la adolescencia, el embarazo, la lactancia y en mujeres menstruantes, es un factor primordial para el alto riesgo de anemia en estos grupos clínicos. Sin embargo, es importante distinguir las causas predisponentes para dicha deficiencia en niños y en adultos, ya que existen diferencias sustanciales, las cuales se resumen a continuación.

Niños

Los niños recién nacidos tienen depósitos de Fe que dependen de la edad gestacional, el peso al nacer, la presencia o no de embarazo múltiple, el tiempo de pinzamiento del cordón umbilical, la presencia de sangrado anormal durante el parto y los depósitos de la madre. Hay que recordar que el niño al nacer tiene una cifra de Hb de $19 \pm 2,2$ g/dL, mientras que a los tres meses de edad es de $11,3 \pm 0,9$ g/dL.

En los primeros seis meses hay tendencia a un balance negativo de Fe, debido al crecimiento y al empleo de leche como alimentación única, sobre todo si se administra leche de vaca. Y es que la biodisponibilidad del Fe es muy alta en la leche materna, pero su concentración es muy baja; y en el caso de la leche de vaca, esta es una fuente pobre de Fe (0,5 g/L, del cual se absorbe solo un 10%). A partir de los seis meses hay mayor riesgo de desarrollar DH, en especial en niños que arrastran un balance negativo de Fe desde el nacimiento.

No obstante, con el uso de Fe oral, fórmulas lácteas suplementadas y una alimentación mixta, particularmente con alimentos fortificados con Fe, se puede prevenir la ADH en esos niños, lo cual es sumamente importante, ya que de otra manera se podrían producir alteraciones cognoscitivas y psicomotoras irreversibles en dichos infantes, como lo han demostrado estudios realizados prospectivamente.

En niños escolares hay que darle especial atención a las parasitosis, sobre todo por nemátodos hematófagos, pues se ha comprobado que un adulto de *Ancylostoma* o *Necator* extrae 0,05 ml de sangre cada día de la mucosa intestinal; de modo que en parasitosis masivas, la cantidad de sangre perdida es considerable.

En cuanto a los adolescentes, se debe mencionar que ellos constituyen un grupo de alto riesgo, debido a malos hábitos alimenticios, crecimiento acelerado e inicio de menstruaciones en las mujeres.

Adultos

En el embarazo se necesita más Fe para cubrir una masa eritrocítica materna aumentada en cerca del 35%, así como por la transferencia de 300 mg de Fe al feto y la pérdida de sangre durante el parto. Aunque la absorción de Fe también está incrementada, se necesita administrar Fe en forma profiláctica o terapéutica cuando la Hb cae por debajo de los 10 g/dL o el VCM está por debajo de 82 fL en el tercer trimestre.

La menorragia o pérdida de 80 ml o más de sangre en cada menstruación es difícil de evaluar clínicamente; sin embargo, la eliminación de coágulos, el uso de gran número de toallas o tampones o períodos menstruales prolongados, sugieren una pérdida excesiva. Por el contrario, se ha estimado que tomaría aproximadamente ocho años para que un hombre adulto normal desarrolle ADH solo como resultado de una dieta pobre o malabsorción que desemboque en ausencia total de captación de Fe.

En la práctica clínica, la ingesta inadecuada o malabsorción son rara vez la única causa de ADH; no obstante, en países en desarrollo sí se puede observar dicha anemia como consecuencia de alimentación por largos años con dietas pobres, fundamentalmente a base de cereales, maíz y vegetales pobres en Fe y que poseen potentes inhibidores de la absorción de Fe.

Cirugías gástricas o duodenales, enteropatía inducida por glúten, gastritis atrófica, ya sea autoinmune o con infección por *Helicobacter pylori*, síndromes de mala absorción como el esprue, así como disminución en la producción o secreción de HCl por cualquier causa, predisponen a DH.

Como regla general, en los varones adultos la principal causa es el sangrado a cualquier nivel del tracto gastrointestinal, originado por ingestión de medicamentos que tengan tendencia a producir diátesis hemorrágica (aspirina), por úlceras (gástricas o duodenales), hemorroides, gastritis, divertículos intestinales o carcinomas. En todo caso, ante DH en el adulto, ya sea hombre o mujer, se debe pensar primero en sangrado y buscar de forma intencional sitios probables de producción de este, aunque el paciente no lo haya advertido, ya que un adulto puede perder crónicamente por intestino hasta 2.000 ml de sangre sin percatarse de ello, y la anemia podría ser la primera manifestación de una neoplasia del tracto gastrointestinal. Esta es una buena razón para no dar tratamiento férrico a un paciente sin haber determinado la causa exacta de la deficiencia, conducta ineludible en todos los casos de ADH.

Aunque es un trastorno raro, no se puede dejar de mencionar la hemosiderosis pulmonar, condición en la que hay hemorragias repetidas en los capilares alveolares, lo cual origina deficiencia, pues el Fe proveniente de la Hb es convertido en hemosiderina por los macrófagos pulmonares, sin que se pueda remover posteriormente de dichas células para ser utilizado en la síntesis del heme. En estos casos, la ADH puede ser el síntoma inicial de la enfermedad.

Manifestaciones clínicas de la ADH

Cuando la DH está en proceso, los depósitos de Fe se depletan completamente antes de que aparezca la anemia, y conforme la condición evoluciona, el paciente puede desarrollar los síntomas generales y signos de anemia como palidez, astenia, debilidad, fatiga, palpitations y cefalea.

Una historia clínica cuidadosa, con una buena exploración, permite sospechar tanto la presencia como la probable etiología de la ADH. Existen síntomas muy característicos, como la pica, que consiste en una alteración de los hábitos alimenticios, en la que el paciente come de manera compulsiva tierra (geofagia), hielo, madera, almidón, plasticina u otros materiales que de otra manera no son comestibles. Esta se corrige después del tratamiento con hierro.

Otros síntomas son: uñas quebradizas, acanaladas

o en cuchara (coiloniquia), glositis no dolorosa y depapilación lingual, estomatitis angular y disfagia como resultado de las membranas faríngeas (Síndrome de Plummer-Vinson). La causa de las alteraciones epiteliales no está bien clara, pero puede estar relacionada con la disminución de Fe en las enzimas que lo contienen. En los niños, la ADH es particularmente significativa, pues puede causar marcada irritabilidad, pobre función cognoscitiva y disminución notoria del desarrollo psicomotor, habiéndose demostrado a nivel científico que estos últimos son irreversibles.

Otras complicaciones de la ADH

Como se sabe, el Fe forma parte de algunas enzimas y es cofactor de otras, y como consecuencia, interviene en procesos metabólicos y de proliferación de todas las células de los mamíferos. Por eso, la ADH no solo origina anemia, sino que tiene implicaciones en la inmunocompetencia y en el desarrollo cognoscitivo y psicomotor. A través de diversas enzimas, el Fe participa en el transporte de electrones en la mitocondria, en el metabolismo de las catecolaminas, en la síntesis del ADN, en la neurotransmisión, entre otros.

En niños con ADH se observa mayor incidencia de infecciones pulmonares y problemas diarreicos, mientras que en embarazadas con ferropenia las infecciones urinarias son las más frecuentes. Lo anterior se debe a la reducción de la inmunidad celular y la fagocitosis por neutrófilos. La DH puede producir hipo o aclorhidria gástrica, ya que induce cambios morfológicos y funcionales en el epitelio gastrointestinal. También puede originar una disminución de la resistencia al esfuerzo físico, por la reducción en las enzimas y proteínas que intervienen en la fosforilación oxidativa (citocromos y enzimas mitocondriales). Por otra parte, se han observado alteraciones neurológicas, como parestesias y anormalidades neurofisiológicas, como aberraciones en el electroencefalograma y en el electrocardiograma.

Diagnóstico

Cuando la anemia es moderada o severa, el diagnóstico es relativamente fácil, sobre todo si se acompaña de un descenso de más de 2 g/dL en la Hb, con disminución del VCM y HCM y de hipocromía en el frotis. En estos casos, si la historia clínica y el examen físico sugieren ADH, en general no se requieren más exámenes diagnósticos, pudiendo hacerse una prueba terapéutica que corroboraría el diagnóstico con aumento de los reticulocitos y de la Hb desde la

primera semana. Por supuesto, esta práctica hay que verla con reserva, tomando en cuenta que la causa que origina la ADH podría enmascarse.

Hallazgos de laboratorio

En sangre periférica

- 1- Anemia variable: depende del grado de DH. En este caso se rompe la relación normal 3:1 entre el Hto. y la Hb. Ejemplo: Hto.: 26 ml/dL y Hb: 6,5 g/dL.
- 2- Cómputo de eritrocitos no muy alterado. Ejemplo: para el Hto. y Hb citados: $3,4 \times 10^6/\mu\text{L}$.
- 3- Cómputo de reticulocitos normal o bajo.
- 4- Leucocitos normales. Puede presentarse neutropenia en un 10% de los pacientes con DH.
- 5- Plaquetas generalmente normales o aumentadas.
- 6- Índices eritrocíticos disminuidos, sobre todo VCM ($<83 \text{ fL}$) y HCM ($<28 \text{ pg}$).
- 7- Anisocitosis dada por microcitosis (eritrocitos más pequeños que los normales).
- 8- Poiquilocitosis: se observan eritrocitos de diferentes formas, siendo frecuente encontrar eliptocitos y esquizocitos hipocrómicos.
- 9- Hipocromía. Se considera demostrada si el CHCM es $<31\%$. Los eritrocitos presentan una zona central clara, que aumenta cuantitativa y cualitativamente conforme avanza la DH.

En médula ósea

Usualmente no es necesario recurrir a este análisis, pues no aporta mayor información. En todo caso, se vería hiperplasia eritroide microeritroblástica, con ausencia de Fe de depósito.

Otros análisis

En algunos casos el diagnóstico no es fácil, en especial si existe algún proceso infeccioso o inflamatorio capaz de modificar las pruebas de laboratorio.

Cuando existen dudas, se puede recurrir a otros estudios como los que se muestran en el Cuadro N° 3. La ferritina sérica sigue siendo uno de los exámenes más útiles y seguros para evaluar el estado de Fe del organismo.

Diagnóstico diferencial

Dos condiciones que se presentan con relativa frecuencia y con las que es pertinente hacer diagnóstico diferencial con ADH, son la anemia de la enfermedad crónica (AEC) y la beta talasemia heterocigota.

En AEC el FeS y la CTFFe están disminuidos y la hemosiderina en MO está normal o aumentada, mientras que en ADH la CTFFe está aumentada y la hemosiderina ausente. Con relación a la beta talasemia, ayudará para la diferenciación entre ambas el cómputo de eritrocitos, que es muy alto en esta última; además, los índices férricos en ella son normales o a veces aumentados. Otro análisis útil es la cuantificación de HbA₂, que se encuentra característicamente superior a 3,5% en beta talasemia.

Estos sencillos exámenes, desde luego aunados al cuadro clínico de cada una de las entidades, son de gran apoyo para el diagnóstico diferencial.

Tratamiento

La prevención de la ADH, administrando Fe en forma profiláctica cuando se presenta un incremento en la demanda, es fundamental, especialmente en lactantes y mujeres embarazadas, sobre todo si se consideran los diferentes estudios que han demostrado alteraciones persistentes del desarrollo psicomotor cuando no se previene la DH en los lactantes.

El tratamiento de elección es el Fe por vía oral, siendo el sulfato ferroso la presentación más utilizada. La dosis promedio es de 3 mg por kg de peso por día, fraccionada en dos o tres tomas. En algunos casos de intolerancia, se podría administrar el Fe dos o tres veces por semana en lugar de usarlo diariamente. Es necesario corregir el nivel de Hb y continuar el tratamiento hasta llenar los depósitos; se estima que esto se puede lograr en un plazo de tres meses, después de normalizar la Hb. Los pacientes que no toleran el Fe por vía oral o que tienen alguna contraindicación para dicho tratamiento, pueden recibir las presentaciones para uso intramuscular o intravenoso existentes en la actualidad en el comercio.

Entre los efectos colaterales que produce el Fe oral están la diarrea en los niños y acidez o constipación en adultos, además de que tiende a manchar los dientes. Como el Fe oral aumenta la acidez gástrica, no es infrecuente que los pacientes se automediquen antiácidos, lo cual disminuye notoriamente la absorción del Fe. Este es un aspecto notable que el médico debe tener en cuenta, en especial en casos de fallas o respuestas lentas al tratamiento con Fe.

A los 7-12 días de iniciar el tratamiento se observa una reticulocitosis que luego decrece. La concentración de Hb se incrementa a partir de la primera semana y debe normalizarse alrededor de las seis semanas de tratamiento. La desaparición de la microcitosis puede tomar hasta cuatro meses. La ferritina permanece

baja, <12 ug/dL, hasta que la anemia se corrija, y luego sube gradualmente conforme los depósitos de hierro se restauran en los próximos meses. Las anormalidades del epitelio comienzan a mejorar en forma rápida con el tratamiento, mientras que la glositis y la coiloniquia pueden tomar varios meses.

Entender los mecanismos del metabolismo del hierro, sus interacciones y manifestaciones será de gran importancia en la orientación diagnóstica y clínica de su deficiencia, lo que redundará en máximo beneficio para la salud del paciente, objetivo fundamental de la investigación médica.

BIBLIOGRAFÍA

Choudhry VP, Naithani R. Current status of iron overload and chelation with deferasirox. *Indian J Pediatr* 2007; 74(8): 759-764.

Fleming RE, Pomka P. Iron overload in human disease. *N Engl J Med* 2012; 366(4): 348-359.

Ganz T, Nemeth E. Hepcidin and disorders of iron metabolism. *Annu Rev Med* 2011; 62: 347-360.

Ganz T, Nemeth E. The hepcidin-ferroportin system as a therapeutic target in anemias and iron overload disorders. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2011; 2011: 538-542.

Ganz T. Hepcidin and iron regulation, 10 years later. *Blood* 2011; 117(17): 4425-4433.

Hoffbrand V, Chaim H, Camaschella C. Iron metabolism, iron deficiency of haem synthesis. En: Hoffbrand V, Catovsky D, Tuddenham EGD, Green AR. *Postgraduate haematology*. 6 ed. Oxford: Blackwell Publishing, Ltd; 2011.

Meynard D, Kautz L, Darnaud V, Canonne-Hergaux F, Coppin H, Roth MP. Lack of the bone morphogenetic protein BMP6 induces iron overload. *Nat Genet* 2009; 41(4): 478-481.

Meyron-Holtz EG, Cohen LA, Fahoum L, Haimovich Y, Lifshitz L, Magid-Gold I, *et al.* Ferritin polarization and iron transport across monolayer epithelial barriers in mammals. *Front Pharmacol* 2014; 5: 194.

Muñoz M, García-Erce JA, Remacha AF. Disorders of iron metabolism. Part 1: Molecular basis of iron homeostasis. *J Clin Pathol* 2011; 64(4): 281-286.

Ortiz Polo I, Paredes Arquíola JM, López Serrano A, Moreno-Osset E. Hemocromatosis: etiopatogenia, diagnóstico y estrategia terapéutica. *Medicine* 2012; 11(19): 1153-1161.

Pérez G, Vittori D, Pregi N, Garbossa G, Nesse A. Homeostasis del hierro. Mecanismos de absorción, captación celular y regulación. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2005; 39(3): 301-314.

Pietrangelo A. Hepcidin in human iron disorders: therapeutics implications. *J Hepathol* 2011; 54(1): 173-181.

Silvestri L, Pagani A, Camaschella C. Furin-mediated release of soluble hemojuvelin: a new link between hypoxia and iron homeostasis. *Blood* 2008; 111(2): 924-931.

Zanitsky J, Young B, Wang HJ, Westerman M, Olbina G, Nemeth E, *et al.* Hepcidin a potential novel biomarker for iron status in chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009; 4(6): 1051-1056.

Zhang D-L, Ghosh MC, Rouault TA. The physiological functions of iron regulatory proteins in iron homeostasis - an update. *Front Pharmacol* 2014; 5: 124.

5

ANEMIA MEGALOBLÁSTICA

Dra. Berta E. Valverde Rojas
Dra. María Rodríguez Sevilla

INTRODUCCIÓN

La anemia megaloblástica, ocasionada en la mayoría de los casos por la deficiencia de ácido fólico y/o de vitamina B₁₂, es el resultado de la síntesis de ADN defectuosa, donde los glóbulos rojos son anormalmente grandes (índices eritrocitarios aumentados). Los eritroblastos en la médula ósea muestran características de detención madurativa nuclear con respecto al citoplasma (asincronismo), producto de la acción de la hemoglobina, que al alcanzar niveles adecuados en el citoplasma funciona como freno mitótico, deteniendo la división celular. La

serie mieloide y megacariocítica se ve afectada por la deficiencia, mostrando asincronismos madurativos entre el núcleo y el citoplasma, con alteraciones morfológicas adicionales. En otros tejidos, las células que se dividen rápidamente también muestran alteraciones, como sucede con el tracto gastrointestinal y el cuello uterino.

Aun cuando la causa más frecuente es la carencia de vitamina B₁₂ o de ácido fólico, las anomalías en el metabolismo de estos nutrientes u otras lesiones en la síntesis de ADN pueden manifestar idénticas características (Cuadro N° 1).

Cuadro N° 1. Aspectos nutricionales de la vitamina B₁₂ y del ácido fólico

	Vitamina B ₁₂	Ácido fólico
Consumo en dietas normales	7-30 µg	200-250 µg
Principales alimentos	Origen animal	La mayoría; especialmente hígado, levaduras y vegetales verdes.
Cocimiento	Poco efecto	Fácilmente destruido.
Requerimiento mínimo normal (adultos)	1-2 µg	100-150 µg
Depósitos	2-3 mg	10-12 mg
Absorción		
Sitio	Íleon	Duodeno y yeyuno.
Mecanismo	Factor intrínseco	Conversión a metil-THF ¹
Límite	2-3 µg/día	50-80% del contenido de la dieta.
Circulación enteropática	5-10 µg/día	90 µg/día
Transporte en plasma	Haptocorrina ² (TC-1) Transcobalamina (TC-2)	Débilmente unido a albúmina
Forma fisiológica intracelular	Metil y desoxiadensilCo ³	Poliglutamatos reducidos

Cuadro N° 1. Aspectos nutricionales de la vitamina B ₁₂ y del ácido fólico		
	Vitamina B ₁₂	Ácido fólico
Formas terapéuticas usuales	Hidroxicobalamina	Ácido fólico

¹ THF: tetrahidrofolato.

² Haptocorrina, previamente conocida como la transcobalamina-1 (TC-1), y la transcobalamina, también llamada transcobalamina-2 (TC-2).

³ DesoxiadenosilCo: desoxiadenosilcobalamina.

VITAMINA B₁₂

La vitamina es sintetizada en la naturaleza por bacterias. Los animales las adquieren al consumir alimento animal, por producción interna de bacterias intestinales (en los rumiantes) o por la ingesta de alimentos contaminados por bacterias. Su estructura consiste en la unión de cuatro cobalaminas que forman un anillo corrínico, con un átomo de cobalto central unido a una porción de algún nucleótido en la quinta valencia de coordinación y a un radical variable (R) en la sexta valencia. En el caso de la B₁₂, hay un grupo CN en el radical, por lo que se conoce como cianocobalamina.

Absorción

Normalmente el consumo diario de vitamina B₁₂ sobrepasa las necesidades. Una vez en el estómago, la acción péptica, facilitada por el pH ácido, libera y une la B₁₂ a una glicoproteína fijadora producida en las glándulas salivales y la mucosa gástrica: la proteína R (cobalofilinas). El complejo glicoproteína R-vitamina B₁₂ pasa al intestino delgado, donde se libera la vitamina B₁₂ por acción hidrolítica de las proteínas pancreáticas y se une al Factor Intrínseco (FI), que es una glicoproteína sintetizada y secretada por las células parietales gástricas. De esta manera, migra al íleon, en cuyas células se encuentra un receptor específico para el FI, la cubilina, que a su vez está asociado a una segunda proteína, la *amnioless*, que promueve la endocitosis del complejo FI-vitamina B₁₂ en el íleon distal, donde la vitamina B₁₂ es absorbida y el FI es destruido. Esta unión se ve favorecida por un pH neutro/básico (6,4-8,4) y calcio iónico. Una vez que la B₁₂ es liberada en el enterocito, se une a la transcobalamina (previamente conocida como TC-II), que es sintetizada en el mismo enterocito; después de un periodo de latencia de varias horas, el complejo sale hacia el Sistema Porta. Se ha descrito una recirculación enterohepática de B₁₂, que actúa para conservar la vitamina donde las cobalaminas activas y los análogos inactivos (0,5-9 µg diarios) son secretados en la bilis unidos a cobalofilinas. Este complejo es hidrolizado

por las enzimas pancreáticas, permitiendo que la B₁₂ libre se una al FI, para seguir el camino de absorción lógica a través de la mucosa ileal (Figura N° 1).

Transporte

En el Sistema Porta, la TC lleva la B₁₂ a la médula ósea, placenta, cerebro y otros tejidos. Es sintetizada por hepatocitos, enterocitos, macrófagos y células hematopoyéticas. Aun cuando transporta bajas cantidades de B₁₂ (20%), la cede rápidamente (horas), lo que hace que sea un mecanismo altamente eficiente. La mayoría de la B₁₂ (80%) en el plasma está unida a otra proteína transportadora, la haptocorrina (antes conocida como TC-I), que es sintetizada por granulocitos y macrófagos, pero que no transfiere la vitamina a la médula ósea, y posee una vida media de 10 días, por lo que representa el verdadero reservorio de B₁₂.

Función bioquímica

La B₁₂ circula por la sangre en tres formas químicas: la metilcobalamina, la hidroxicobalamina y la adenosilcobalamina. El complejo TC-B₁₂ se internaliza en las células por endocitosis y pasa a los lisosomas, donde libera la cobalamina por proteólisis. Posteriormente, una fracción de esta se metila en el citoplasma, formando la metil-cobalamina; mientras que la otra fracción penetra en la mitocondria transformándose, por reducción y adenosilación, en adenosil-cobalamina.

La metil-cobalamina se acopla como coenzima a la enzima metiltransferasa, responsable de la metilación de la homocisteína, para formar metionina. Además de impedir la acumulación de la homocisteína y con ello sus efectos tóxicos, la consecuencia más importante de esta reacción es la de regenerar tetrahidrofolato (THF) necesario para recibir nuevas unidades de carbono, llevando a efecto la misión metabólica de los folatos, que es la de transferir unidades de carbono. Por otro lado, en la mitocondria, la adenosil-cobalamina se une a la enzima metilmalonilCoA-mutasa, que asiste

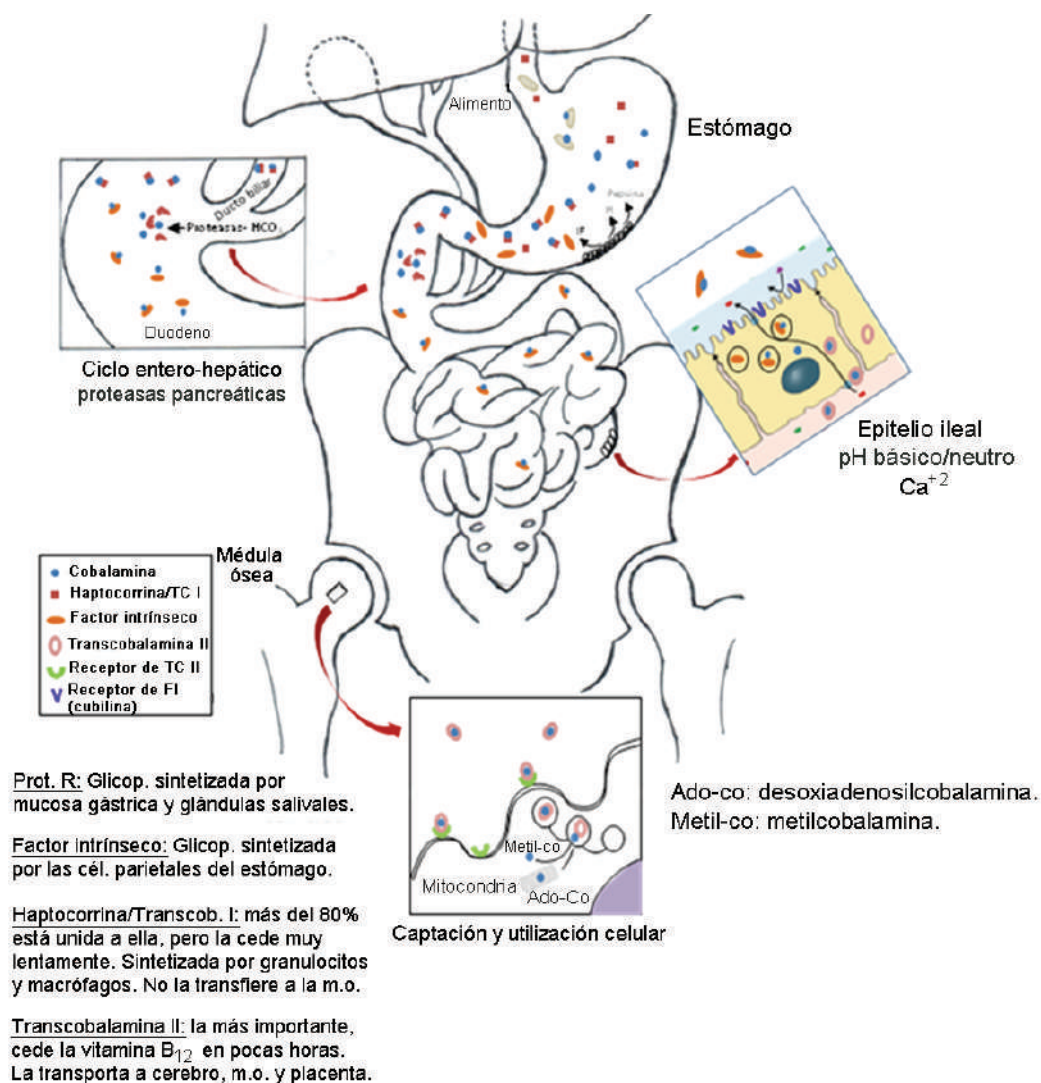


Figura N° 1. Absorción de la vitamina B_{12} . (Adaptado de: Carmel R. Cobalamin deficiency; 2001).

la conversión de metilmalonil-CoA a succinil-CoA en el Ciclo de Krebs, interviniendo de este modo en el catabolismo del propionato, sin guardar relación con los procesos de síntesis del ADN, sin relacionarse con el ácido fólico y sin intervenir en la aparición de la megaloblastosis.

ÁCIDO FÓLICO

Los humanos son incapaces de sintetizar el folato como vitamina. El ácido fólico consta de una molécula de ácido pteróico unida a una de ácido glutámico, formando el ácido pteroil-glutámico. Al ácido glutámico se le pueden unir otros glutamatos mediante uniones carboxi-amino, hasta un número de 7-8, constituyendo los poliglutamatos o folilpoliglutamatos, que es tal y como se encuentran en la naturaleza. Los espárragos, el brócoli, las espinacas y la lechuga son los vegetales más ricos en ácido fólico, además de las vísceras, como

el hígado y el riñón, las levaduras y los champiñones (Figura N° 2).

Absorción

La mayor parte de los folatos se absorben en el yeyuno proximal. En la luz intestinal, los poliglutamatos del ácido fólico deben ser hidrolizados, mediante a-glutamyltranspeptidasas (conjugasas) existentes en las microvellosidades y en lisosomas de los enterocitos, a monoglutamatos, que es la forma molecular capaz de ser absorbida por la mucosa intestinal. El monoglutamato resultante (ácido pteroilmonoglutámico), pasa al interior del enterocito por medio de un sistema de transporte, receptor específico. En el citoplasma del enterocito se reduce tetrahidrofolato (THF) y posteriormente se metila a 5N-metil THF, que es la principal forma activa, pasando de esta manera al torrente sanguíneo y de ahí a las células, mediante receptores

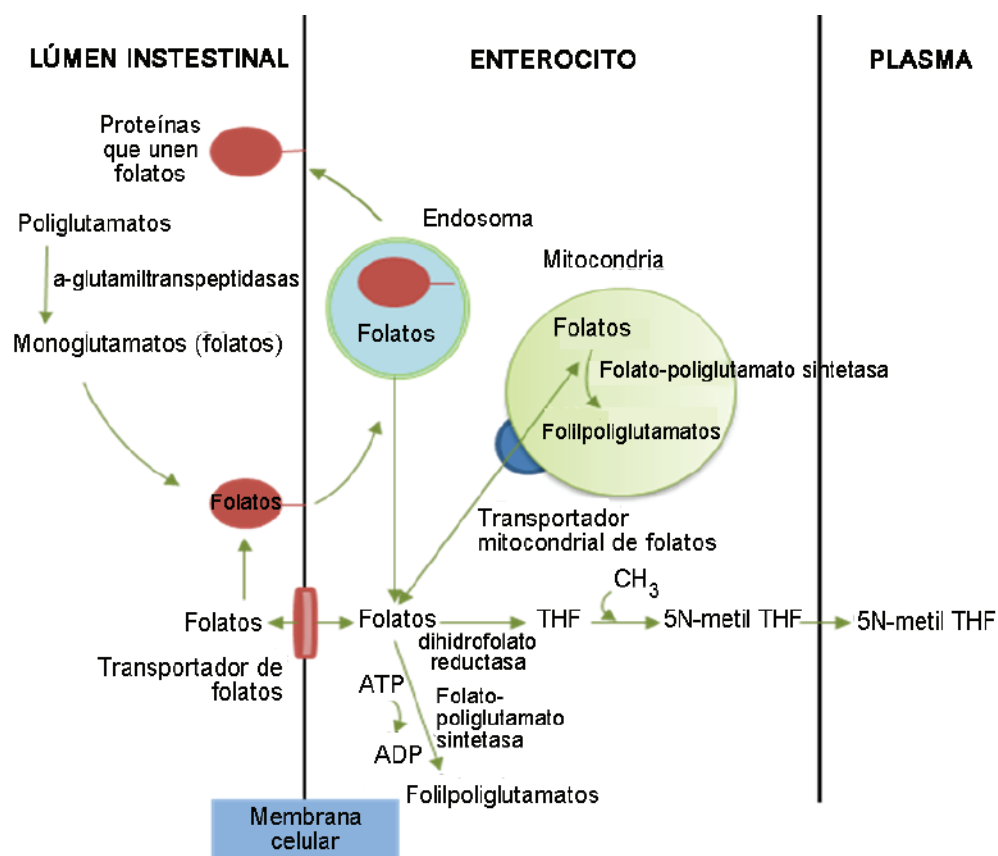


Figura N° 2. Absorción del ácido fólico. (Adaptado de: Bridges KR, Pearson HA. Nutritional anemias; 2008).

de alta afinidad. Una vez dentro de las células, añadirán ácido glutámico para formar poliglutamatos y mantenerse así en las células, y resisten la proteólisis uniéndose a proteínas fijadoras, que son auténticas enzimas activas del metabolismo de unidades de carbono. No hay proteínas plasmáticas específicas que aumenten la captación celular de los folatos.

Función bioquímica

Los folatos se necesitan en una variedad de reacciones bioquímicas que involucran la transferencia de un carbono en interconversiones de aminoácidos o en síntesis de precursores de purinas. Para que los folatos puedan intervenir en el metabolismo celular, necesitan estar en forma de monoglutamatos, por lo que se produce hidrólisis de los poliglutamatos de depósito mediante la intervención de conjugasas intracelulares; estas, a diferencia de las conjugasas del enterocito, transforman los folilpoliglutamatos a 5N-10-metilénTHF, que es el cofactor de la timidilato sintetasa. El THF es una molécula fundamental en los procesos metabólicos que requieren la incorporación de unidades de carbono, porque tiene la propiedad de tomar y ceder carbonos, como ocurre en el paso de serina a glicina, de uridina a timidina, de formiminoglutámico a

glutámico, de homocisteína a metionina, de glicinamida a formilglicinamida y de imidazolcarboxamida a formiminoimidazolcarboxamida. El THF no puede ser sustituido por el dihidrofolato (DHF), por lo que se da un mecanismo regenerador en las células, el cual se realiza mediante la enzima dihidrofolato-reductasa, que reduce a la DHF con dos hidrógenos provenientes del NADPH (Figura N° 3).

Por otro lado, en el interior de la célula se está produciendo la regeneración continua de metionina a expensas de la homocisteína, evitando la acción tóxica de esta. El proceso consiste en la remetilación de la propia homocisteína, siendo el 5N-metil THF el donante del grupo metilo. Este metilo es cedido a un grupo prostético de la cianocobalamina, formando la metilcobalamina que se acopla a la enzima metiltransferasa. En este proceso metabólico se evidencia la interrelación del ácido fólico con la vitamina B₁₂. En un déficit global de cobalamina o de metilcobalamina, se acumula el 5N-metil THF, bloqueando su regeneración a THF e impidiendo la formación del 5N-10-metilénTHF junto con otros compuestos de THF portadores de unidades de carbono activo, situación que frena la síntesis de timidina desde uridina, al no poder producirse la metilación adecuada de este último.

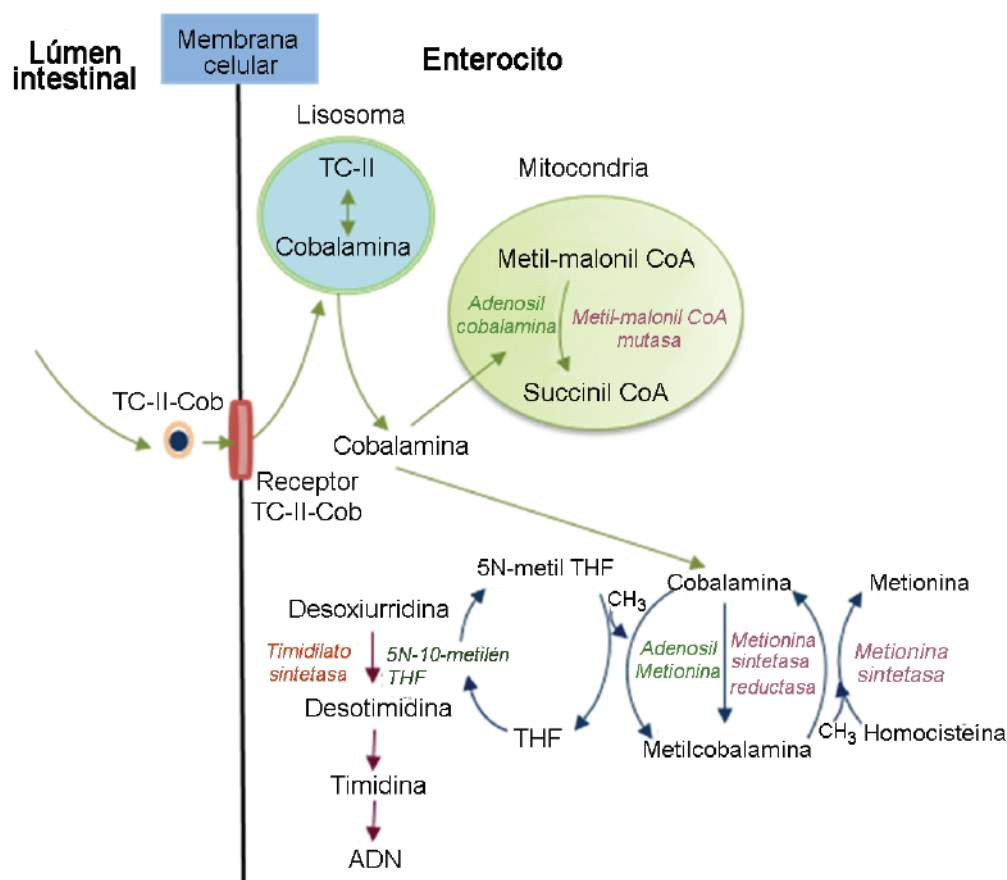


Figura N° 3. Base bioquímica de la anemia megaloblástica debido a la deficiencia de vitamina B₁₂ y ácido fólico en la síntesis del ADN. (Adaptado de: Bridges KR, Pearson HA. Nutritional anemias; 2008).

CAUSAS DE ANEMIA MEGALOBLÁSTICA

La anemia megaloblástica se debe, por lo general, a la deficiencia de vitamina B₁₂ o ácido fólico, aunque ocasionalmente pueden encontrarse otras causas. A continuación se explican las causas según su etiopatogenia.

Deficiencia de vitamina B₁₂

- γ Aporte insuficiente: vegetarianismo, especialmente en quienes no consumen huevos ni leche.
- γ Disminución en la secreción de factor intrínseco: gastritis autoinmune (anemia perniciosa), gastritis atrófica crónica, gastrectomía parcial o total.
- γ Deficiencia de proteasas pancreáticas: Síndrome de Zollinger-Ellison (inactivación de las proteasas por el exceso de ácido), insuficiencia pancreática.
- γ Disminución en la absorción: resección extensa del íleon, síndrome del asa ciega (alteraciones anatómicas que favorecen la colonización por bacterias que captan la vitamina B₁₂), infestación por *Diphyllobotrium latum* (helminthos intestinales

que provienen del pescado crudo y que captan la vitamina).

Deficiencia de ácido fólico

- γ Aporte insuficiente: ingesta disminuida, edad avanzada, malnutrición, alimentación parenteral, alcoholismo.
- γ Requerimientos aumentados: embarazo, lactancia, prematuridad, crecimiento rápido en la infancia.
- γ Aumento en el consumo: anemias hemolíticas crónicas, enfermedad maligna (linfoma, leucemia, mieloma múltiple, carcinoma), enfermedades inflamatorias (artritis reumatoidea, psoriasis, dermatitis exfoliativa).
- γ Mala absorción: resección extensa del yeyuno o síndromes de mala absorción (esprue tropical y no tropical, enfermedad de Chron).
- γ Aumento en las pérdidas: diálisis crónica, insuficiencia cardíaca congestiva, hepatopatía crónica.
- γ Medicamentos anticonvulsivantes (fenitoína, fenobarbital), inhibidores de la dihidrofolato reductasa (metotrexate, trimetoprim, pirimetamina,

sulfasalazina), análogos de las purinas o pirimidinas (zidovudina, 5-fluorouracilo, mercaptopurina, azatioprina).

Otras causas de anemia megaloblástica

- Defectos congénitos, como la aciduria orótica, en la que hay un defecto en la síntesis de purinas.
- Anemia megaloblástica que responde a la tiamina.
- Síndrome de Lesch-Nyhan.
- Errores del metabolismo de los folatos.
- Errores del metabolismo de la vitamina B₁₂.

Manifestaciones clínicas

La anemia generalmente se instaura de manera lenta, y cuando se desarrolla, la clínica del paciente puede ser secundaria a la anemia: fatiga, debilidad y mala tolerancia al ejercicio. Además, puede notarse ictericia leve, la cual se da por el aumento de la bilirrubina indirecta, causado por eritropoyesis ineficaz. Asimismo, es posible encontrar glositis y queilitis angular (lesiones en las comisuras de los labios). Adicionalmente, son frecuentes la anorexia y la pérdida de peso. Puede haber diarrea intermitente o constipación.

Los pacientes con trombocitopenia pueden tener sangrados anormales, especialmente equimosis y petequias. De igual manera, cuando es significativa la leucopenia, puede haber una mayor predisposición a las infecciones.

La deficiencia de vitamina B₁₂ o ácido fólico producen hiperhomocisteinemia y esta, a su vez, aumenta el riesgo de trombosis, tanto arterial como venosa.

Es frecuente la infertilidad en hombres y mujeres con anemia megaloblástica, y la deficiencia de ácido fólico se ha relacionado con abortos a repetición. Además, durante el embarazo aumenta la incidencia de defectos del tubo neural en el feto (anencefalia, mielomeningocele, espina bífida) y de labio leporino.

La deficiencia de vitamina B₁₂ produce una neuropatía periférica bilateral, con afección de cordones posteriores y tractos piramidales. También puede manifestarse con síntomas cerebrales o psiquiátricos o atrofia óptica. Clínicamente pueden presentarse parestesias en guantes y en calcetín, trastornos de la marcha o trastornos visuales. De manera adicional, se pueden producir trastornos psiquiátricos o demencia, que incluso puede preceder al cuadro hematológico.

Manifestaciones de laboratorio (Figura N° 4)

Morfología de médula ósea

Estas anemias se caracterizan por la presencia de células de mayor tamaño de lo normal (serie rojas, blanca, trombocítica), asincronismos madurativos y marcadas alteraciones morfológicas. La eritropoyesis ineficaz es una de las manifestaciones más comunes de la anemia megaloblástica y se refiere a la destrucción intramedular de las células hematológicas, producto de la alteración en la síntesis del ADN, lo que conduce a una hiperplasia en la médula ósea, con disminución celular en sangre periférica (pancitopenia).

Los megaloblastos (eritroblastos de mayor tamaño) proporcionalmente tienen más citoplasma, la maduración del núcleo es más lenta que la del citoplasma, mientras que la concentración de hemoglobina alcanza el nivel en que se frena la mitosis, originando el clásico asincronismo núcleo-citoplasma. Los megaloblastos dan origen a eritrocitos grandes (macroцитos), que pueden tener forma ovoide (megalocitos), con un VCM aumentado, los cuales deben diferenciarse de otros macroцитos, como los reticulocitos de desviación. Las alteraciones son más evidentes en los eritroblastos policromatófilos y los ortocromáticos en los que aún se pueden observar núcleos con cromatina fina. En la médula ósea megaloblástica son frecuentes las mitosis y los cambios diseritropoyéticos, como eritroblastos multinucleados, núcleos en “palomita de maíz”, en trébol, con cariorrexis, con cuerpos de Howell Jolly, punteado basófilo, etc.

Los megacariocitos también pueden ser anormalmente grandes, con poca granulación citoplasmática, y el núcleo puede mostrar lóbulos disminuidos y separados.

En serie blanca también son evidentes los asincronismos núcleo-citoplasma y las células tienden a ser más grandes que las normales, sobre todo a partir del metamielocito, apareciendo las clásicas bandas gigantes propias de esta entidad.

Morfología de sangre periférica

La pancitopenia (disminución cuantitativa de todas las líneas celulares) es la manifestación usual de la anemia megaloblástica.

- Anemia variable, dependiendo de la severidad de la deficiencia vitamínica, con cómputo de eritrocitos bajo. La anisocitosis estará dada por macroцитos, megalocitos y esferocitos; y la poiquilocito-

sis por dacriocitos, esquizocitos y eliptocitos. Los cuerpos de inclusión, como el punteado basófilo, punteado azurófilo, los anillos de Cabot y los cuerpos de Howell Jolly, son evidentes. Los índices eritrocíticos están aumentados y los conteos de reticulocitos son bajos o normales.

- γ Leucopenia variable. Se observan macropolicitos, que son neutrófilos con cinco o más lobulaciones del núcleo. Estos son elementos de gran importancia en el diagnóstico de la anemia megaloblástica.
- γ Trombocitopenia variable.

Pruebas bioquímicas

- γ Hierro sérico elevado, debido al aumento del recambio plasmático 3-5 veces de lo normal.
- γ Bilirrubina indirecta aumentada, por eritropoyesis ineficaz y disminución de la vida media del eritrocito.
- γ Aumento de la deshidrogenasa láctica, debido a la hemólisis moderada de los eritrocitos circulantes.
- γ Aumento de otras enzimas celulares, como aldolasas, transaminasas y lisozimas, producto de la destrucción intramedular de los leucocitos.

Determinación de deficiencia de vitamina B₁₂ y ácido fólico

- γ En la actualidad se dispone de métodos de radioinmunoensayo (RIA) e inmunoenzimáticos (ELISA) que permiten la determinación simultánea de vitamina B₁₂ en suero y en plasma, y de ácido fólico en suero, plasma y eritrocitos. Los valores de referencia normales dependen del método.
- γ Se debe tomar en cuenta que ante la deficiencia de vitamina B₁₂ se elevan los niveles de ácido fólico sérico, a menos que exista déficit concomitante de folatos.
- γ La presencia de ácido metil-malónico en orina es un índice sensible de deficiencia de vitamina B₁₂, excepto en casos de errores innatos del metabolismo.
- γ La excreción elevada de FIGLU (ácido formiminoglutámico) evidencia la deficiencia de ácido fólico, luego de suministrar al paciente una carga de histidina.

La función de la Vitamina B₁₂ y del ácido fólico en la síntesis del ADN, los convierte en metabolitos esenciales para una adecuada formación celular.

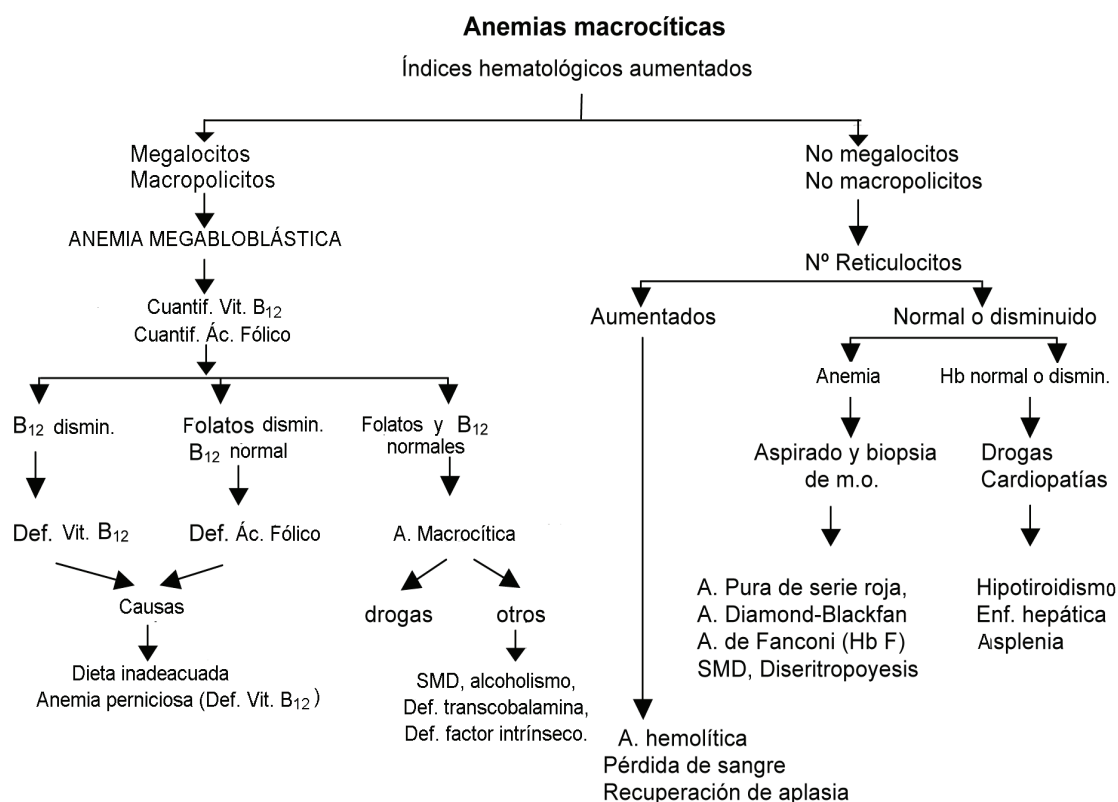


Figura N° 4. Algoritmo para el diagnóstico de las anemias macrocíticas.

Su deficiencia debe ser considerada cuidadosamente, tomando en cuenta que su presentación clínica involucra diagnóstico diferencial con enfermedades malignas, coagulopatías, alteraciones neurológicas y anomalías en la formación del tubo neural del neonato; todas ellas, patologías de alto riesgo que ponen en peligro la vida del paciente.

BIBLIOGRAFÍA

Bridges KR, Pearson HA. Nutritional anemias En: Bridges KR, Pearson HA (editores). Anemia and other red cell disorders. New York: McGraw-Hill Co.; 2008.

Carmel R. Cobalamin deficiency. En: Carmel R, Jacobsen DW (editores). Homocysteine in health and disease. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 2001. p. 289-305.

Fyfe JC, Madse M, Hojrup P, Christensen EI, Tanner SM, de la Chapelle A, *et al.* The functional cobalamin (vitamin B₁₂)-intrinsic factor receptor is a novel complex of cubilin and amnionless. Blood 2004; 103(5): 1573-1579.

Hoffbrand AV, Moss PAH, Pettit JE (editores). Essential haematology. 5 ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 2006.

Lee R, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer J, Rodgers G. Wintrobe's clinical hematology. 10 ed. Baltimore: Williams and Wilkins; 1998.

Sills RH. Practical algorithms in pediatric hematology and oncology. Basel, Switzerland: Karger; 2003.

ANEMIA APLÁSICA, APLASIA DE SERIE ROJA, HEMOGLOBINURIA PAROXÍSTICA NOCTURNA Y OTRAS PANCITOPENIAS

Dr. German F. Sáenz Renauld

Dra. Marta Navarrete Durán

Dra. Gabriela Granados Brenes

ANEMIA APLÁSICA

La anemia aplásica es un raro desorden de las células madres hemopoyéticas, que suscitan un devastador fallo medular, precisamente por disfunción germinativa de toda la hematopoyesis. En términos sencillos, se le define como una pancitopenia ligada a una médula ósea hipoplástica (desértica y grasosa), en ausencia de leucemia o de infiltración maligna.

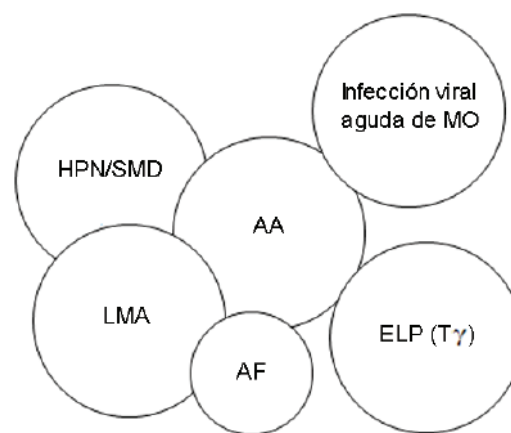
El término de anemia aplásica adquirida (AAA) lo introdujo en 1900 Chauffard, en París, para describir un cuadro de hipoplasia o aplasia medular con pancitopenia en sangre periférica, señalando múltiples factores etiológicos. Sin embargo, su estudio se remonta a 1888, cuando Paul Ehrlich describió el caso de una mujer que murió después de una enfermedad, tras presentar anemia severa, fiebre y neutropenia.

La fisiopatología de la anemia aplásica adquirida implica un mecanismo inmune en la mayoría de los casos, por lo que, salvo algunas restricciones semánticas, la anemia aplásica de los tipos adquiridos se pueden considerar como enfermedad autoinmune, donde linfocitos T autoreactivos citotóxicos median en la destrucción de las células madres. La primera evidencia de autoinmunidad en anemia aplásica, viene de experimentos que muestran que los linfocitos de los pacientes inhiben *in vitro* la generación de colonias hemopoyéticas autólogas y alogénicas.

En este tipo de anemia, las células CD34 y los progenitores hemopoyéticos se encuentran bastante reducidos en número. Está claro que persisten células madres en la médula ósea en esta condición, ya que una recuperación completa de la hemopoyesis ocurre en muchos casos con una eficaz terapia inmunosupresora. Se ha tratado de explicar esta situación de la siguiente manera: las células madres más primitivas, que representan menos del 10% del total de las células CD34 positivas, deberían ser relativamente imperceptibles a las células T autoreactivas; por lo que las células hemopoyéticas madres "más maduras" se convertirían en las principales células diana del ataque inmune en la anemia aplásica.

Similar a otras enfermedades autoinmunes, la anemia aplásica tiene un curso clínico variable. Algunos pacientes presentan síntomas leves que no requieren tratamiento o este es muy ligero. En otros se presenta como una pancitopenia que pone en peligro la vida, con verdaderos casos de emergencia. La exposición a drogas, virus, insecticidas y toxinas, se considera un disparador de una respuesta inmune aberrante en algunos pacientes.

La hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN) y los síndromes mielodisplásicos (SMD) surgen comúnmente en personas con anemia aplásica (Figura N° 1), lo cual demuestra una relación entre estos desórdenes clonales. Por ello, deben efectuarse estudios citogenéticos (para SMD) y de citometría de flujo (para HPN).



HPN: hemoglobinuria paroxística nocturna; **SMD:** Síndrome mielodisplásico; **AA:** anemia aplásica; **LMA:** leucemia mieloide aguda; **AF:** anemia Fanconi; **ELP (Tγ):** enfermedad linfoproliferativa tipo Tγ.

Figura N° 1. Asociación entre la anemia aplásica y enfermedades hematológicas relacionadas.

Existe una interrelación real entre la anemia aplásica, la mielodisplasia, la HPN y el síndrome leucémico, debido a la etiología común del daño a nivel de ADN. El hecho de que solo algunas infecciones virales ordinarias resulten en aplasia es, probablemente, función del sistema inmune. La proliferación monoclonal no malig-

na de linfocitos citotóxicos semejantes a los detectados en ciertos tipos de anemia aplásica, terminan en enfermedad linfoproliferativa tipo T_H.

Patofisiología

Cuando el número de células totipotenciales hematopoyéticas disminuyen por debajo de sus niveles críticos, estimados en 10% de lo normal, predomina la capacidad de autorreplicación a expensas del sacrificio de la capacidad de diferenciación. Esto implica una alteración extrínseca o intrínseca de proliferación y/o diferenciación de las células primarias no orientadas a orientadas, lo cual se manifiesta en hipoplasia o aplasia medular, que conlleva a anemia, hemorragia y susceptibilidad a las infecciones. Esto se corrobora en la morfología del frotis de medula ósea y en el hallazgo histológico de la biopsia de medula ósea, con poblaciones celulares variables, según la severidad del problema. En las hipoplasias medulares clásicas, el número de células hematopoyéticas pluripotenciales disminuye por debajo del nivel crítico, para mantener la autorreplicación propia de las células pluripotenciales. De esta forma, se agotan las células bien diferenciadas en el tejido de la médula ósea y la cavidad medular es ocupada por tejido adiposo.

Cabe destacar que la AAA es la tercera causa de pancitopenia, precedida de enfermedades sistémicas y malignas, y es la mayor secuela de exposición a radiaciones, químicos, infecciones virales, drogas, embarazo u otras enfermedades.

Incidencia

La incidencia de la AAA en el mundo es de cuatro casos por millón en niños menores de 14 años, siendo más frecuente entre los tres y cinco años de edad; aunque hay reportes en niños menores de dos años, así como casos severos en el periodo neonatal.

En Costa Rica, en el Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera, la AAA corresponde al 4% de las anemias hospitalarias infantiles y se presenta con mayor frecuencia en edades preescolares y escolares.

En general, la AAA varía entre uno y cinco casos nuevos por millón de habitantes por año en países como Estados Unidos de Norteamérica; 6 casos por millón en Tailandia y más de 14 casos por millón por año en Japón. La gran variación pareciera deberse más a problemas del medio ambiente y a exposición a sustancias tóxicas, que a problemas de orden racial. Además, podría deberse también al número de casos reportados y a los diferentes criterios diagnósticos aplicados. Por este último aspecto es que no se puede mencionar una incidencia exacta de la anemia

aplásica a nivel mundial. Sin embargo, se sabe que es más común en los países orientales (sudeste de Asia) que en los del Oeste (occidente, anglosajones).

En China se reportan 18,7 casos por millón de habitantes y 13 en Suecia. En España se registran 2,2 casos por millón, cifra que podría aplicarse a Costa Rica. La alta frecuencia de este padecimiento en algunos países puede verse influenciada por la carga genética de la raza asiática, donde la incidencia del padecimiento es muy elevada. Aunque esta variación geográfica probablemente también tenga relación con un factor ambiental.

La distribución por edades indica que la mayoría de los casos ocurre en pacientes que se encuentran en las primeras tres décadas de vida, y con un segundo pico de incidencia, entre la quinta y la sexta década. Entre el 20 y el 30% de la anemia aplásica observada en la infancia es de origen hereditario o genético.

Es difícil, en todo caso, evaluar la etiología de este padecimiento por varias razones:

- a. La incidencia extremadamente baja de la enfermedad.
- b. El gran número de individuos expuestos a un mismo agente etiológico potencial, en comparación con los pocos individuos que se ven afectados, lo que eleva la pregunta de una ocurrencia coincidental.
- c. La ausencia de una estimación exacta de la población expuesta, así como la variabilidad en el grado y tiempo de exposición a un agente dado.
- d. La frecuencia simultánea a varios agentes potencialmente tóxicos.

Por lo general, una droga o un agente químico pueden estar implicados en la etiología del 30% de los casos.

Pronóstico

Los conteos sanguíneos son los indicadores más importantes del pronóstico. El control del sangrado ha sido el mayor impacto en la supervivencia; ya que el sangrado fue la mayor causa de muerte en las primeras grandes series reportadas, mientras que en la actualidad se presentó una proporción abrumadora de las muertes por infección. Según el grado de severidad de la presentación y evolución de la AAA, se clasifica en leve, moderada o severa.

Se denomina **aplasia moderada** si existen los siguientes criterios:

- γ Recuento absoluto de neutrófilos menor de 1.000/dl.

- γ Recuento de plaquetas menor de 80.000/dl.
- γ Cantidad de reticulocitos corregidos es menor a 1%.

Por otra parte, se clasifica como **aplasia severa** si:

- γ La médula ósea presenta menos del 25% de la celularidad hematopoyética normal.
- γ Están presentes dos o tres de los siguientes criterios:
 - Recuento de plaquetas menor de 20.000/dl.
 - Recuento de neutrófilos menor de 500/dl.
 - Cantidad de reticulocitos corregidos es menor del 1%.
 - Dependencia de transfusiones.

Algunos consideran una cuarta categoría, **AA muy severa**, si existe:

- γ Recuento de neutrófilos menor a 200/dl.

La **aplasia leve** no reúne los criterios anteriores.

Cabe mencionar que *The International Agranulocytosis and Aplastic Anemia Study* admite como causa probable de la entidad, el contacto con sustancias químicas que ocurre como mínimo durante 29 días en los 180 días previos a la admisión del enfermo.

Aproximadamente, un 25% de los pacientes tienen un curso rápido y fatal menor de cuatro meses, 50% mueren dentro del primer año después del diagnóstico y el 10% tiene un curso benigno.

Características clínicas

La característica más común es la palidez y el sangrado, mientras que los síntomas dependerán de la severidad de la pancitopenia. El sangrado es la manifestación de mayor alarma, debido a la plaquetopenia, y puede presentarse desde petequias y equimosis, hasta sangrados masivos de algún órgano, especialmente asociados con procesos infecciosos, drogas o procedimientos traumáticos, como catéteres intravenosos. La anemia es de inicio insidioso y el paciente puede presentar fatiga, apnea y

Cuadro N° 1. Clasificación de la anemia aplásica	
Anemia aplásica adquirida	Anemia aplásica hereditaria
Secundaria - Radiación. - Drogas y químicos. Efectos regulares: - Agentes citotóxicos. - Benceno. Reacciones idiosincráticas: - Cloranfenicol. - Antiinflamatorios no esteroideos. - Antiepilépticos. - Oro. - Otras drogas y químicos. Virus: - Virus de Epstein-Barr. - Hepatitis no A no B. - Virus de inmunodeficiencia humana (VIH). Enfermedades inmunes: - Fasceitis eosinofílica. - Hipoinmunoglobulinemia. - Timoma y carcinoma tímico. - Enfermedad injerto vs huésped. - Hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN). - Embarazo. Anemia aplásica idiopática.	- Anemia de Fanconi. - Disqueratosis congénita. - Síndrome Shwachman-Diamond. - Disgenesia reticular. - Trombocitopenia amegacariocítica. - Anemia aplásica familiar. - Preleucemia (monosomía 7). - Enfermedades no hematológicas. (Síndrome de Down, Dubowitz, Seckel).

acúfenos. Si coexistiera sangrado de mediana a gran intensidad, la hemoglobina podría reducirse y llevar al paciente al fallo cardíaco. La infección es secundaria a la neutropenia y no es frecuente al diagnóstico, y su severidad se desarrollará de acuerdo con la cifra de neutrófilos. El dolor óseo es poco frecuente y no hay adenomegalias, esplenomegalia ni hepatomegalia. Esta última puede encontrarse si el paciente presenta anemia severa con descompensación cardíaca.

Etiología

La mayoría de los casos son por exposición a radiación o por químicos, drogas o infecciones virales (Cuadro N° 1); el parvovirus B19 puede causar la V enfermedad exantemática en seres humanos, fetopatía en mujeres embarazadas, *hydrops fetalis* y cuadros poliarticulares. En la anemia aplásica la forma adquirida es la más frecuente y se presenta entre el 40 y el 60% de los casos. Aproximadamente, más del 50% de todos los casos AAA son idiopáticos y en la mejor situación, autoinmunes. Como se mencionó antes, hay un pequeño porcentaje en el cual está presente una condición asociada, que eleva la posibilidad de una relación etiológica. Dentro de ellas se encuentra la HPN. De un 20% a un 30% son de origen hereditario o genético, 80% de los pacientes tienen estatura baja y entre 15% y un 50% cursa con algunas de estas alteraciones: sindactilia, disminución del número de huesos del carpo, microsomía, microcefalia, malformaciones renales, estrabismo, hipogenitalismo, criptorquidia, retardo mental o sordera.

Diagnóstico

El diagnóstico se hace al encontrarse pancitopenia en sangre periférica, con disminución de dos o tres de las líneas celulares, con una médula ósea hipoplásica o aplásica y con menos del 25% de celularidad normal o menos del 50% de la celularidad y menos del 30% de su hematopoyesis sin antecedente de enfermedad concomitante, sin haber recibido tratamiento para esta. La morfología de los glóbulos rojos es normocítica-normocrómica o macrocítica con reticulocitopenia, y siempre debe confirmarse con el aspirado y biopsia de médula ósea.

De acuerdo con los criterios mencionados, debe valorarse la severidad de la anemia. El diagnóstico diferencial se muestra en el Cuadro N° 2.

Cuadro N° 2. Diagnóstico diferencial

Pancitopenia con médula ósea hipocelular:

- Anemia aplásica adquirida.
- Anemia aplásica hereditaria.
- Algunos síndromes mielodisplásicos.
- Leucemia aleucémica.
- Leucemia linfoblástica aguda.
- Linfomas.

Pancitopenia con médula ósea celular. Enfermedades primarias de médula ósea:

- Síndromes mielodisplásicos.
- Hemoglobinuria paroxística nocturna.
- Mielofibrosis.
- Leucemia aleucémica.
- Mieloptisis.
- Linfoma.
- Leucemia de células peludas.

Enfermedades sistémicas secundarias:

- Lupus eritematoso diseminado.
- Hiperesplenismo.
- Deficiencia de vitamina B₁₂ o ácido fólico.
- Infección sistémica.
- Alcohol.
- Brucelosis.
- Sarcoidosis.
- Tuberculosis y micobacteria atípica.

Citopenia con médula ósea hipocelular:

- Fiebre Q.
- Enfermedad de los Legionarios.
- Anorexia nervosa.
- Micobacteria.
- Tuberculosis.
- Hipotiroidismo.

Tratamiento

El tratamiento estándar y curativo de la anemia aplásica severa es el trasplante de células madre. Para poder realizar el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos, se deben evaluar los factores como edad, presencia de un donante hermano con compatibilidad completa o idéntica, infecciones y frecuencia de transfusiones, pudiéndose alcanzar niveles de curación hasta en el 90% de los pacientes que reúnen los mejores criterios de selección. La otra alternativa es la terapia inmunosupresora, con la cual se puede obtener en promedio un 70% de respuestas parciales o completas en menores de 60 años, mientras que en mayores disminuye a un 20%, basándose en la dependencia transfusional, con tiempos de supervivencia total prolongada semejante a los pacientes trasplantados, 61% vs 63% con gammaglobulina antilinfocítica, ciclosporina, esteroides y unidad formadora de colonias. Según estudios reportados, la globulina antitumoral se deja para los retratamientos.

En Costa Rica se realizó una revisión de 25 casos de niños tratados por anemia aplásica, entre los años 1990 y 2002. Estos se dividieron en tres grupos, de donde se extrae la siguiente información: en el primer grupo se trataron 11 niños con anabólicos, dos de ellos tuvieron respuesta total, tres parcial, cuatro no tuvieron respuesta y dos fallecieron. La sobrevida en ellos fue menor a cinco años en el 70% de los casos. En el segundo grupo, ocho pacientes fueron tratados con inmunosupresores (esteroides, unidad formadora de colonias, ciclosporina y globulina antitímocítica): dos respondieron bien, uno respondió parcialmente y cinco no lograron superar la enfermedad. La sobrevida en ellos a los cinco años fue del 40%. El tercer grupo, de seis pacientes, se trató con trasplante de médula ósea; dos personas tuvieron respuesta total y los otros cuatro fallecieron en los primeros tres meses posteriores al trasplante, con una sobrevida del 20% a los cinco años. De los 25 casos estudiados, 13 se encontraban vivos a los cinco años del diagnóstico; de esos 13, seis hicieron remisión completa, cuatro parcial y tres tienen enfermedad activa. En total, 10 niños fallecieron: seis en los primeros dos años del diagnóstico

y cuatro lograron una tasa de sobrevida superior a los cinco años.

APLASIA SELECTIVA DE SERIE ROJA (ASSR)

Con el término de eritroblastopenia o aplasia pura de serie roja, se describe un tipo de anemia caracterizada por la afectación aislada de la serie roja, acompañada de reticulocitopenia intensa. Las series granulopoyéticas y megacariocítica no se hallan alteradas. Estas aplasias pueden ser agudas o crónicas.

La ASSR puede ser adquirida (Síndrome de Kaznelson) o hereditaria (anemia de Diamond-Blackfan) (Cuadro N° 3), siendo la primera más frecuente, y se clasifica como primaria (autoinmune) o idiopática y secundaria, sea por Timoma, enfermedades no hematológicas (pulmón, tiroides, etc.), infecciones (VIH, paperas, hepatitis viral, CMV, parvovirus B19, etc.), drogas y químicos, anemia hemolítica, lupus diseminado, embarazo, fallo renal severo o francas deficiencias nutricionales.

Cuadro N° 3. Clasificación de las ASSR
Congénitas (hereditarias)
- Eritroblastopenia hereditaria de Blackfan-Diamond. - Eritroblastopenia transitoria de la infancia (autoinmune).
Adquiridas
Agudas: - Idiopática (primaria: autoinmune). - Asociada con el curso de hemólisis crónicas e infecciones agudas por parvovirus B19. - Por fármacos y productos químicos. - Fallo renal agudo. Crónicas: - Idiopática (eritroblastopenia idiopática crónica del adulto, a menudo autoinmune). - Asociadas a timoma, LLC, mieloma, linfoma. - Fármacos y productos químicos. - SMD. - Insuficiencia renal crónica. - Déficit grave de nutrición.

La ASSR se puede producir por inmunoglobulinas inhibitorias (IgG) hacia la serie roja; más raro aún contra la Epo. La inhibición de la serie roja por células T_y (que tienen receptores para la porción Fc de la molécula IgG) ocurre en las leucemias linfocíticas crónicas, B o T.

Eritroblastopenias adquiridas

Como se observa en el Cuadro N° 2, las eritroblastopenias adquiridas se pueden clasificar en agudas y crónicas. Entre las formas agudas se incluyen los brotes aplásicos que pueden surgir en el curso de procesos

hemolíticos crónicos, hereditarios o adquiridos (esferocitosis hereditaria, anemia hemolítica autoinmune, anemia drepanocítica, etc.), así como en el curso de algunas infecciones agudas (sepsis meningocócica, neumonía, enfermedades víricas: parvovirus). Tales crisis eritroblastopénicas se describen con el nombre de síndrome de Passer y suelen durar de 7 a 15 días; durante ese tiempo desaparecen los eritroblastos de la médula ósea y los reticulocitos del hemograma y solo queda alguna forma gigante poliploide en médula ósea. Las series blanca y megacariocítica no se alteran. La crisis anémica puede pasar clínicamente inadvertida, puesto que la supervivencia de los hematíes es de 120 días. Ciertos fármacos y algunos productos químicos pueden provocar una aplasia pura de la serie roja y también se ha descrito esta posibilidad en el curso de una insuficiencia renal aguda. En los casos en que no es posible descubrir el agente causal, la eritroblastopenia se denomina como idiopática.

PANCITOPENIA

La pancitopenia señala una disminución absoluta de las células sanguíneas; lo cual suele ser común en muchas enfermedades, tal como se vio en la anemia aplásica. El estudio de la pancitopenia obliga a evaluar el grado de las citopenias, el valor del VCM y del índice reticulocitario. También se debe realizar un análisis cuidadoso del frotis de sangre periférica, un estudio del concentrado de leucocitos, un estudio de la médula ósea (aspirado y biopsia) y la determinación del valor de las fosfatasas alcalinas leucocitarias.

Los desórdenes que deben ser considerados en la evaluación diagnóstica de pacientes con pancitopenia son:

- A. Anemia aplásica.
- B. Reemplazo medular:
 1. Mielofibrosis, mieloesclerosis.
 2. Osteoporosis.
 3. Carcinoma metastásico.
 4. Leucemia aguda.
 5. Mieloma múltiple.
 6. Enfermedad de Hodgkin, linfoma.
 7. Enfermedad de Gaucher, Nieman-Pick, Letterer-Siwe.
 8. Síndromes mielodisplásicos.
- C. Hiperesplenismo:
 1. Esplenomegalia congestiva.
 2. Enfermedad de Hodgkin, linfoma, leucemia.
 3. Enfermedad de Gaucher, etc.
 4. Kala-azar, sarcoidosis.
 5. Pancitopenia esplénica primaria, tropical.

- D. Infecciosos:
 1. Tuberculosis miliar.
 2. Enfermedad micótica diseminada.
 3. Septicemia fulminante.
 4. Malaria.
 5. Infección por VIH.
- E. Enfermedad por:
 1. Deficiencia de B₁₂ y de ácido fólico.
 2. Deficiencia de piridoxina.
- F. Coagulopatía de consumo.
- G. HPN.
- H. Otros: síndrome antifosfolípido.

Identificación de la pancitopenia

Cuando se identifica una pancitopenia simple debe hacerse la medición de los otros tipos de células. El diagnóstico de la pancitopenia es diferente al de una citopenia aislada; por ese motivo, la cuantificación de todas las células es la primera etapa en la evaluación. La pancitopenia es el resultado de la producción insuficiente de todas las células sanguíneas -como sucede en la anemia megaloblástica, la anemia aplásica, los síndromes displásicos o la leucemia-, o bien, producto de la destrucción acelerada de todo tipo de células sanguíneas como resultado de hiperesplenismo o de inmunocitopenia.

La antigua práctica de dar principal atención a la anemia, ha conducido a los términos anacrónicos de anemia aplástica y anemia megaloblástica. En estos dos trastornos también se encuentra alterada la producción de granulocitos y plaquetas, perturbación que constituye una pista importante para el diagnóstico.

Desde el punto de vista clínico, uno puede apreciar las siguientes características generales en torno a la pancitopenia:

Interrelaciones clínicas de la pancitopenia

Pancitopenia + esplenomegalia: leucemia, linfoma, fibrosis medular, Gaucher, esplenomegalia congestiva, leucemia células peludas.

Pancitopenia + adenopatías: linfoma, LED, SIDA, E. Wäldenstrom, LLA.

Pancitopenia + signos de hemólisis: HPN.

Pancitopenia + esplenomegalia - ganglios: mieloma múltiple, SMD hipoplásico.

La pancitopenia periférica se puede catalogar de la siguiente forma:

•γ **Hiperesplenismo:**

- a) Hipertensión portal (esplenomegalia congestiva): cirrosis hepática, hepatitis crónica activa, hemocromatosis, E. Wilson, cirrosis biliar.
- b) Linfoma, L. crónica, talasemia mayor, mielofibrosis, sarcoidosis, Gaucher.

- γ **Inmune:** S. Evans, LED, medicamentos (raro), síndrome antifosfolipídico. No es infrecuente el hallazgo de un hemograma pancitopénico en ciertos procesos infecciosos (actualmente es muy notable en el Sida).

Pancitopenia e infección

La pancitopenia, producto de la hipoplasia medular, se ha reportado principalmente asociada a enfermedades virales, en especial hepatitis C y parvovirus B19, consecuencia del acortamiento en la supervivencia del eritrocito y otras líneas celulares por inserción del ADN viral en el ADN celular, durante la fase de duplicación del ADN. Asimismo, pacientes infectados con el VIH presentan médulas hipoplásicas, pero muy raramente llegan a la aplasia medular. Otros agentes infecciosos han sido involucrados con pancitopenias; sin embargo, los cambios que se producen en la médula ósea por infección aguda son, por lo general, transitorios, reversibles y autolimitados; no así en las infecciones crónicas. Algunas de las patologías infecciosas implicadas son:

- γ Tuberculosis miliar.
- γ Micobacterias atípicas.
- γ Micosis sistémica.
- γ Septicemia fulminante.
- γ Paludismo.
- γ Epstein-Barr (raro).
- γ Infección por VIH.

CITOPENIA EN SIDA

La citopenia en el Sida se produce por:

- γ Daño directo a células germinativas.
- γ Conversión a mielodisplasia.
- γ Mecanismo inmune.
- γ Otras: infecciones oportunistas y tratamientos.

Citopenia en Sida: etapa diagnóstica

- γ Linfocitos CD4+ ↓.
- γ Anemia 70% casos.

- γ Neutropenia 50%.
- γ Trombocitopenia 40%, con o sin síndrome antifosfolípido.
- γ Linfocitopenia 70%.

EVALUACIÓN DEL PACIENTE CON PANCITOPENIA

La causa de la pancitopenia puede encontrarse mediante la revisión de la historia clínica, del examen físico, del recuento de células sanguíneas y del examen cuidadoso de un frotis de sangre. Puede requerirse una biopsia de médula ósea para confirmar el diagnóstico en algunos casos.

HALLAZGOS DE LABORATORIO EN PANCITOPENIA

Existe una considerable variabilidad en los grados de citopenia presente en una determinada enfermedad. Además, la correlación entre el descenso en la cuenta de un tipo celular y en otra es imperfecta; por ejemplo, en las anemias megaloblásticas puede coexistir anemia severa con granulocitopenia moderada y trombocitopenia leve; ocasionalmente, un tipo celular puede estar en el límite normal inferior en el momento del diagnóstico. Por lo tanto, en un inicio el trastorno es una bicitopenia.

La pancitopenia que resulta de la insuficiencia de la médula ósea puede variar de leve a severa, según el grado de la lesión medular. La esplenomegalia que se produce como resultado de una enfermedad no hematológica, como sucede con una hipertensión portal, se acompaña de una reducción en los recuentos celulares que de ordinario es funcionalmente insignificante. Por esa razón, no es probable que ocurra hiperesplenismo no complicado si la concentración de hemoglobina es menor de 10 g/dl, el recuento de granulocitos menor de 2.000/ul o el de plaquetas inferior a 75.000/ul. Cabe destacar que las reducciones severas en los recuentos celulares son casi siempre una manifestación de fallo medular.

El volumen corpuscular medio (VCM) de los eritrocitos es una determinación importante, puesto que es muy improbable que ocurra una anemia megaloblástica si el VCM es menor a 100 fl. Aun cuando se debe considerar que en la anemia aplásica pueden presentarse ocasionalmente eritrocitos grandes.

El recuento de reticulocitos es muy útil para determinar el grado de insuficiencia de la médula ósea, puesto que el déficit en la eritropoyesis con frecuencia es paralelo al de otras células. Asimismo, puede deducirse la presencia de hemólisis -como resultado de hiperesplenismo- si el índice de reticulocitos es elevado

(usualmente en la pancitopenia es menor a 1,0). De igual forma, la morfología de leucocitos es valiosa para identificar los neutrófilos hipersegmentados propios de la anemia megaloblástica, los eritroblastos que se producen por invasión de la médula ósea de cáncer metastásico o los blastos circulantes, células de linfoma y otras anormalidades. Si el recuento de leucocitos es muy bajo, se debe hacer un frotis de la capa leucocítica de la sangre periférica centrifugada en un tubo de sedimentación de 1 ml.

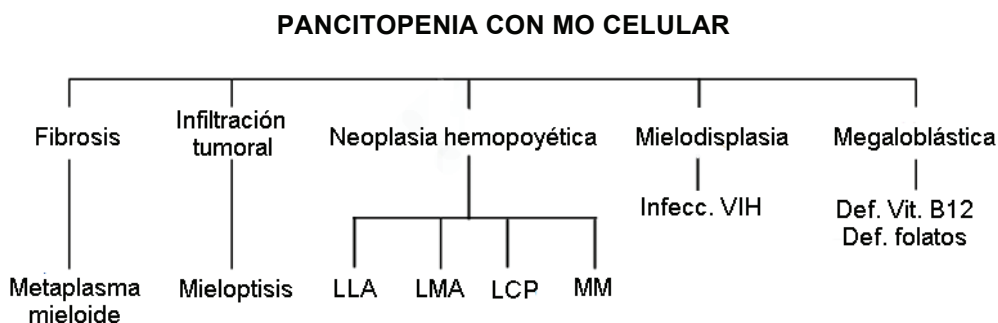
Examen de la médula ósea

Normalmente, puede hacerse un diagnóstico de anemia megaloblástica (pancitopenia) y leucemia después de realizarse un hemograma. Sin embargo, el diagnóstico de pancitopenia debe confirmarse con un examen de la médula ósea. En muchos casos, puede requerirse biopsia de médula ósea, puesto que la muestra aspirada tal vez no es representativa de la celularidad medular, como es el caso de la aplasia medular. Ade-

más, la presencia de fibrosis de la médula ósea solo puede asegurarse por medio de biopsia.

Es posible que no pueda detectarse infiltración de linfoma, cáncer metastásico o ciertos tipos de invasión leucémica en un aspirado hipocelular, pero puede ser evidente en la biopsia de médula. El aspirado de médula ósea con frecuencia proporciona mejores preparaciones citológicas y debe acompañar a la biopsia. La celularidad de la médula ósea constituye un punto de partida útil para considerar el diagnóstico diferencial de pancitopenia.

La pancitopenia central puede estar asociada a acelularidad, hipocelularidad o hiper celularidad de la médula ósea. En este contexto, la acelularidad implica hipocelularidad marcada, puesto que hay linfocitos y células residuales presentes en una médula ósea gravemente aplásica. La pancitopenia central, con médula ósea celular, se puede desglosar de la siguiente manera:



Datos asociados: esplenomegalia, hepatomegalia, adenopatías, anisopoiquilocitosis, blastos, plaquetas anormales, linfocitos anormales, cuadro leucoeritroblástico.

Frecuentemente, es posible llegar a un diagnóstico a partir de la historia clínica, el recuento de células sanguíneas y de reticulocitos, así como del estudio del frotis de sangre. La celularidad de la médula ósea también es una guía clave y se usa en el esquema anterior para ramificar el árbol diagnóstico.

SÍNDROME MIELODISPLÁSICO

El síndrome mielodisplásico engloba un grupo de desórdenes clonales biológica y clínicamente heterogéneos, caracterizados por hematopoyesis ineficaz y citopenias periféricas, debido a un aumento de la apoptosis y a la tendencia a evolucionar a fallo medular o leucemia aguda. Por lo general, la médula ósea es hiper celular. Esto representa una hematopoyesis ineficaz, es decir, un aumento en la proliferación de

células, pero una incapacidad de madurar para convertirse en células totalmente diferenciadas.

LEUCEMIA AGUDA

Las leucemias mieloide y linfoide agudas pueden presentarse con pancitopenia. En casi todos los casos presenta anemia con trombocitopenia. En no menos de una tercera parte de los casos hay leucopenia; recuento total normal de leucocitos en otra tercera parte y recuento elevado de leucocitos en el resto.

Usualmente, el diagnóstico se sospecha después de una inspección cuidadosa de la sangre, puesto que los blastos leucémicos están casi siempre presentes. Puede ser útil el concentrado de leucocitos para identificar blastos, si el recuento de los leucocitos es bajo. La biopsia de médula ósea proporciona evidencia inequívoca del diagnóstico. No hay explicación satisfactoria alguna para la variación de los blastos o de los niveles de los recuentos de leucocitos en la sangre durante la leucemia aguda.

MIELOFIBROSIS

La anemia y la trombocitopenia son muy frecuentes en los pacientes con mielofibrosis (metaplasma mieloide). Estas alteraciones coinciden en aproximadamente la tercera parte de los pacientes mientras que la leucopenia ocurre en alrededor de una quinta parte.

La enfermedad y la trombocitopenia en personas mayores de 40 años de edad se caracterizan por palidez, fatiga, esplenomegalia muy manifiesta, anemia y células en lágrima (dacriocitos) frecuentes en el frotis de sangre, así como punteado basófilo. Las cantidades de granulocitos y plaquetas pueden ser reducidas normales o elevadas. En prácticamente todos los pacientes hay granulocitos inmaduros en la sangre.

Esta patología constituye una causa poco frecuente de pancitopenia y se analiza con mayor detalle en el capítulo de síndromes mieloproliferativos crónicos.

LINFOMA

En casi todos los casos de linfoma nodular y en una gran proporción de aquellos con linfoma difuso, se produce infiltración focal de la médula ósea por lo que se mantiene la hematopoyesis. Por esa razón, la pancitopenia es una manifestación temprana poco común de linfoma, que se presenta solo en un porcentaje reducido de casos. Los pacientes con linfoma y pancitopenia frecuentemente presentan linfadenopatía, hepatomegalia y esplenomegalia. Los recuentos de células sanguíneas pueden estar extremadamente reducidos, con un hematocrito menor del 25%, un recuento de granulocitos inferior a 1.500/ul y de plaquetas inferior a 75.000/ul. A menudo no se obtienen células en el material aspirado; no obstante, la biopsia muestra infiltración difusa de células de linfoma, mal o bien diferenciadas.

LEUCEMIA DE CÉLULAS PELUDAS

Este padecimiento poco común, conocido anteriormente como reticuloendoteliosis leucémica, se caracteriza por la proliferación de una célula mononuclear maligna en la médula ósea, el hígado y el bazo. Fatiga, infección, hemorragia y sensación de plenitud en el cuadrante superior izquierdo pueden hacer que el paciente acuda en busca de atención médica. La linfadenopatía se presenta rara vez, mientras que la esplenomegalia constituye una característica constante de la enfermedad y es común que haya pancitopenia. Ocasionalmente, el recuento de leucocitos es elevado, debido a la abundancia de células mononucleares atípicas (peludas). En los pacientes el material aspirado de la médula ósea suele ser hipocelular, aunque el es-

crutinio puede permitir la identificación de células mononucleares atípicas. La biopsia de médula ósea revela infiltración de células mononucleares, que puede ser extendida o en focos. Por lo general, hay aumento en la fibrosis y, si las células mononucleares atípicas son poco frecuentes, la biopsia puede confundir el padecimiento con mielofibrosis. En muy pocos pacientes la presentación puede ser solo trombocitopenia.

El diagnóstico se hace por la identificación de las células mononucleares atípicas, ya sea en la sangre, la médula ósea o el bazo, las cuales pueden tener aspecto de linfocitos con proyecciones citoplasmáticas, de donde reciben su nombre de "células peludas". Estas células tienen una isoenzima de la fosfatasa ácida, resistente al tartrato, que puede identificarse por técnicas citoquímicas que proporcionan ayuda en su caracterización. En algunos casos se requiere biopsia de médula ósea repetida o esplenectomía para identificar las células tumorales. Las leucopenias graves frecuentemente mejoran después de la esplenectomía, la cual fue por mucho tiempo el tratamiento de elección. En la actualidad, existen tratamientos a base de alfa interferón y de antimetabolitos, que han dado excelentes resultados en esta leucemia crónica (por ejemplo, pentostatina y la dos clorodeoxiadenosina).

MIELOMA Y MACROGLOBULINEMIA

La supresión de la hematopoyesis en la médula ósea por células plasmáticas malignas proliferantes conduce a anemia, granulocitopenia y trombocitopenia; de esta forma, el mieloma múltiple puede presentarse al médico como una pancitopenia. Además, la mayoría de los pacientes tendrán dolor óseo de la espalda o de otras partes, o fracturas. El 20% de los pacientes con mieloma no presentan hipergamaglobulinemia y, por lo tanto, no tendrá formación patológica de acúmulos de eritrocitos en forma de pilas de monedas en los frotis de sangre, ni elevación del pico de la IgM en la electroforesis de las proteínas del plasma. En pacientes sin componente M en el suero, es característica la excreción urinaria elevada de proteínas (Bence-Jones), detectables por el ácido sulfasalícílico, pero no por cintas comerciales, ya que en estas su sensibilidad es por albúmina, por "error proteico".

CARCINOMA METASTÁSICO

El carcinoma puede propagarse a la médula ósea y producir un grave descenso en los recuentos de las células sanguíneas. Los neuroblastomas en los niños y los carcinomas del pulmón, mama, próstata, estómago y riñón en los adultos, son los que se propagan con mayor frecuencia a la médula ósea. Normalmente, se sabe que está presente el tumor, y la invasión

y la citopenia son consecuencia de su crecimiento progresivo. Aunque se considera que los eritroblastos y los granulocitos inmaduros son signos sanguíneos de cáncer ya metastatizado a la médula ósea, la presencia de anemia y trombocitopenia sin células inmaduras en la sangre, es la manifestación más común de tumor en la médula ósea. En la serie roja de los frotis de sangre periférica los dacriocitos aparecen frecuentemente. La biopsia de la médula ósea puede ser un medio más sensible de detección de células carcinomatosas, que una muestra aspirada. Aunque es discernible una invasión intensa de la médula ósea, puede ser muy difícil la identificación de células atípicas (no hematológicas) en pequeña cantidad.

ANEMIA MEGALOBLÁSTICA

Casi todos los pacientes con anemia megaloblástica tienen deficiencia de folatos o de vitamina B₁₂. Las manifestaciones clínicas difieren de la causa de la deficiencia, aunque las anormalidades morfológicas son idénticas.

PANCITOPENIA CAUSADA POR AUMENTO EN LA DESTRUCCIÓN DE LAS CÉLULAS SANGUÍNEAS: HIPERESPLENISMO

El hiperesplenismo es el mecanismo por el cual el bazo, cuyo tamaño ha aumentado, secuestra o destruye los granulocitos, las plaquetas y los eritrocitos, a una velocidad que excede a la de su producción medular. En sentido estricto, implica que las células son intrínsecamente normales y que no están recubiertas con anticuerpos. El diagnóstico se sugiere por la presencia de esplenomegalia y anemia de grado leve o moderado, granulocitopenia, trombocitopenia o alguna combinación de estas citopenias.

En la pancitopenia inmune, la eliminación esplénica de las células sanguíneas puede hacerse grave si las células son cubiertas por anticuerpos. El concepto de citopenia inducida por autoanticuerpos está bien establecido en el caso de la anemia hemolítica y de la trombocitopenia inmune (PTI). En forma semejante, los autoanticuerpos pueden dirigirse contra los granulocitos (neutropenia autoinmune). El recubrimiento de anticuerpos produce como resultado un retiro acelerado de las células sanguíneas de la circulación. En la mayoría de los casos, los autoanticuerpos se dirigen contra un tipo celular. Con poca frecuencia pueden estar afectados dos o tres tipos celulares. En 1951, el Dr. Robert Evans sugirió la presencia de inmunopancitopenia, con base en sus estudios de dos pacientes que presentaban leucopenia y trombocitopenia junto con anemia hemolítica inmune, y quienes se supone, tenían anticuerpo contra

cada tipo celular. Algunos pacientes con este tipo de problema tienen o desarrollan lupus eritematoso sistémico, o poseen el síndrome antifosfolípido. Puede presentarse nefritis, artralgias, poliserositis, anticuerpos antinucleares y una prueba positiva de factor antinúcleo. Aunque se ha demostrado que ciertos medicamentos causan anemia hemolítica, granulocitopenia o trombocitopenia inducidas por anticuerpos, es raro que un medicamento simple produzca pancitopenia inmune.

El tratamiento de la pancitopenia inducida por anticuerpos depende de la gravedad del síndrome y de si está relacionado con lupus eritematoso. Si la pancitopenia es leve (anemia hemolítica compensada, ausencia de hemorragia trombocitopénica y un recuento de granulocitos adecuado para prevenir una infección -más de 750 células/ul-, puede no ser necesario el tratamiento. En el caso del lupus eritematoso y del síndrome de Evans, ambos pueden tratarse con glucocorticoides. Después de administrar por varias semanas el medicamento, este debe reducirse gradualmente en un intento de suspenderlo. Si la pancitopenia no responde al tratamiento o recae con dosis bajas de prednisona, el médico deberá considerar la posibilidad de esplenectomía, especialmente si el bazo ha aumentado de tamaño.

SÍNDROME DE INMUNODEFICIENCIA ADQUIRIDA (SIDA)

El Sida es un conjunto de signos y síntomas clínicos causados por el virus (VIH) o por las infecciones que lo acompañan. La gran preocupación suscitada por el virus, se debe a que la enfermedad ha alcanzado proporciones epidémicas en casi todo el mundo. Además, la enfermedad tiene una alta mortalidad. En la actualidad existen protocolos terapéuticos que ofrecen una relativa buena calidad de vida.

Las células susceptibles a la infección por el virus son los linfocitos CD4+ (linfocitos cooperadores/inductores) y las células del linaje de los fagocitos mononucleares, en las cuales el virus replica continuamente, a pesar de una constante y a menudo vigorosa respuesta inmune del huésped. De hecho, la producción de anticuerpos a los diferentes componentes virales, sirve como el principal medio para determinar la presencia de infección por este virus; también, permite detectar una respuesta inmune mediada por células, caracterizada por la proliferación de células T o de la capacidad citotóxica.

Es importante tener en cuenta que el VIH puede permanecer latente o expresarse crónicamente a bajo nivel por períodos prolongados, haciendo que

el período de incubación en personas infectadas sea de hasta 10 años. Con el tiempo, la infección viral subclínica evoluciona hasta una disfunción inmunológica, por destrucción selectiva de los linfocitos CD4+, vulnerabilizando al huésped al ataque de infecciones oportunistas y enfermedades malignas, y produciendo, finalmente, la muerte del huésped. Hasta el momento, las explicaciones planteadas sobre el por qué no se detiene la diseminación de la infección y la aparición de la enfermedad en la mayoría de las personas, a pesar de la existencia de una respuesta inmune específica, son las siguientes:

- a) Niveles inadecuados de respuestas tumorales y celulares en los sitios de infección primaria.
- b) Inducción de respuestas inmunes dirigidas contra las regiones inmunodominantes de poca importancia, o inducción de respuestas competidoras que facilitan la diseminación viral.
- c) Alto grado de mutación y recombinación viral, que produce una repetida evasión de la respuesta inmune, hasta que el compromiso del sistema inmune impida el reconocimiento específico de los mutantes.
- d) Inducción de anticuerpos, inicialmente protectores, que por reacciones cruzadas crean efectos autoinmunes y pierden la función inmune protectora.
- e) Compromiso de funciones efectoras a través de patrones alterados de diferenciación.
- f) Producción de citoquinas normales y la generación de mecanismos regulatorios que controlan la hiperactividad del sistema inmune en pacientes víricos y que secundariamente impiden respuestas protectoras.

Además de la destrucción de los linfocitos CD4+, hay otras líneas celulares que muestran profundos defectos funcionales en las personas infectadas con el VIH; estas son:

- γ Los linfocitos B (CD19+): las deficiencias a nivel de linfocitos B son principalmente funcionales y se manifiestan como activación policlonal, hipergamaglobulinemia, complejos inmunes circulantes, autoanticuerpos y como una respuesta humoral deficiente contra antígenos nuevos.
- γ Los linfocitos T citotóxicos/supresores (CD8+): la supresión de estos linfocitos tiene especial significado, ya que se ha demostrado *in vitro* que estas células tienen la capacidad de inhibir la replicación del VIH.
- γ Las células NK (natural killer, CD54): las células NK no disminuyen significativamente en número, pero su capacidad citotóxica está disminuida en comparación con individuos no infectados.

Por otra parte, cabe mencionar que en el síndrome de inmunodeficiencia adquirida suele presentarse pancitopenia, en especial trombocitopenia y macrocitosis.

HEMOGLOBINURIA PAROXÍSTICA NOCTURNA (HPN)

La HPN es una enfermedad hematológica de tipo clonal, producto de una alteración a nivel de la célula madre pluripotente. Como consecuencia de este defecto, se origina una hemopoyesis defectuosa, que incluye alteraciones en los eritrocitos, las plaquetas, los granulocitos y los linfocitos. La enfermedad posee además las características de una anemia hemolítica intravascular.

La primera descripción de HPN se atribuye a un caso de hemoglobinuria matutina, con otros signos de hemólisis, en 1882. Luego, en 1911 se demostró que los eritrocitos de un paciente eran lisados tanto en presencia de suero normal como anormal.

Patogénesis

Siendo un trastorno adquirido que se origina a partir de una célula madre mutada, se ha asociado una mayor probabilidad de aparición de la clona alterada, en individuos que ya tienen algún daño previo medular. En este sentido, se ha ligado con la anemia aplásica adquirida (AAA) y se ha postulado que ambas entidades hematológicas pueden compartir la misma patogenia.

La población de eritrocitos derivados de la clona transformada, se caracteriza por poseer alteraciones en la membrana que provocan mayor susceptibilidad a la lisis mediada por el complemento e incremento del depósito de la fracción C3 en los glóbulos rojos.

Al ser un trastorno que afecta la célula tronco pluripotente, el defecto se encuentra también en otras células hemopoyéticas. El daño central se describe en el glicofosfatidilinositol (GPI). Este funciona como una unión o ancla entre la capa hidrofóbica lipídica y diversas proteínas hidrofílicas (Figura N° 1). Se postula un mecanismo de mutación somática que interrumpe la síntesis temprana del GPI. El trastorno genético se ha identificado en el gene *PIG-A* ligado al cromosoma X.

Una de las consecuencias más importantes de este trastorno, es la producción de una serie de alteraciones en diversas proteínas ligadas al GPI. Entre estas se encuentran aquellas que regulan la acción del complemento. Ello produce una población celular incapaz de expresar las proteínas ligadas a este anclaje con el GPI membrana.

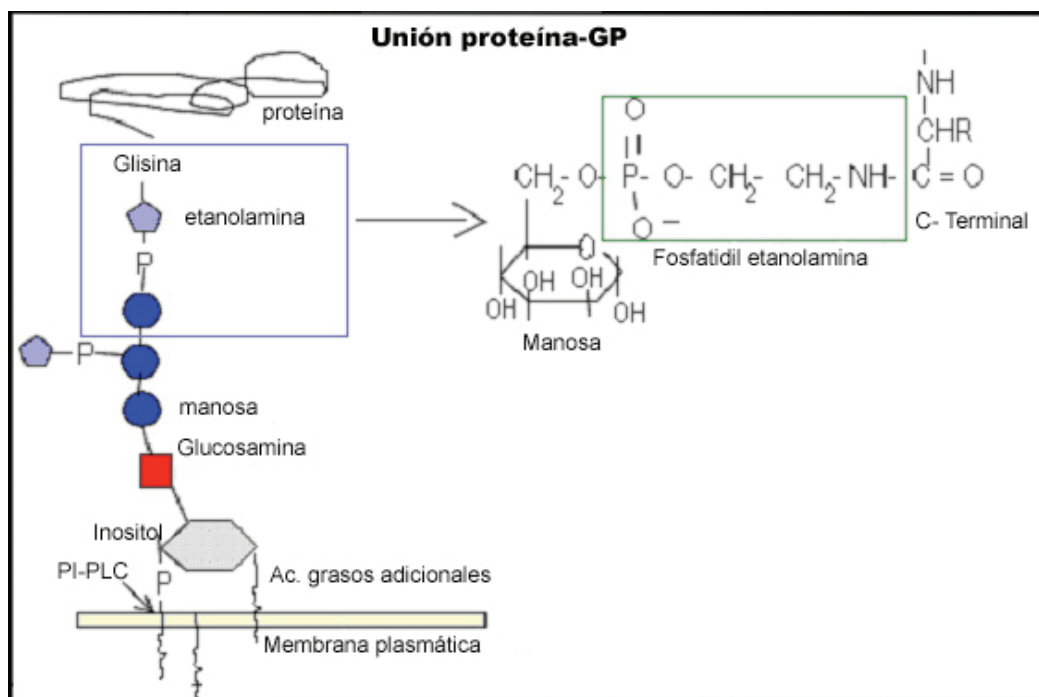


Figura N° 2. Relación entre proteínas y la unión del glicosfatidil inositol a la membrana plasmática.

Se ha argumentado que las células madre HPN⁺ poseen una ventaja de crecimiento sobre las progenitoras normales con el GPI normal. Sin embargo, estudios recientes han aportado nuevas explicaciones adicionales. De estas, la más importante es que tras analizar la asociación con la anemia aplásica adquirida (AAA) y la HPN, se ha sugerido que ambas pueden compartir defectos comunes; se cree que participa un fenómeno de autoinmunidad que explica la etiología de la HPN. Entre los argumentos destaca que tanto la AAA como la HPN pueden tratarse y responder a la inmunosupresión. Esta hipótesis indica que un ataque autoinmune sobre las células pluripotentes normales, produce una ventaja selectiva de las clonas HPN. Además, se ha encontrado en individuos normales algunas células HPN⁺ y se ha determinado que si la mutación en el gene *PIG-A* ocurre en personas HPN⁻, esto no induce a una proliferación clonal anormal. Por tanto, esta teoría indica que si bien es cierto el defecto en este gene es un factor necesario para el desarrollo de la HPN, no es un factor suficiente y debe ligarse a un mecanismo adicional, como la autoinmunidad.

Diagnóstico diferencial, evolución y tratamiento

La HPN debe incluirse en el diagnóstico diferencial de cualquier cuadro que curse con citopenias persistentes de etiología desconocida. Debe diferenciarse principalmente de la anemia aplásica, situación que a veces es complicada, ya que como se mencionó, ambas

entidades se han correlacionado. Además, aunque presentan características clínicas y de laboratorio distintas, las citopenias crónicas son hallazgos comunes en diversas entidades hematológicas malignas, como la mielofibrosis con metaplasia mieloide, la leucemia de células peludas, la leucemia aguda y la mielodisplasia.

BIBLIOGRAFÍA

- Araten D, Luzzato L. The mutation rate in *PIG-A* is normal in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). *Blood* 2006; 108(2): 734-736.
- Araten D, Nafa K, Padeesuan K, Luzzato L. Clonal populations of hematopoietic cells with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria genotype and phenotype are present in normal individuals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 5209-5214.
- Bacigalupo A, Hows J, Gluckman E, Nissen C, Marsh J, Van Lint MT, *et al.* Bone marrow transplantation (BMT) versus immunosuppression for the treatment of severe aplastic anemia (SAA): a report of the EBMT SAA working party. *Br J Haematol* 1988; 70(2): 177-182.
- Dinçol G, Aktan M, Diz-Küçükkaya R, Yavuz S, Nalçacı M, Öztürk S, *et al.* Treatment of acquired severe aplastic anemia with antilymphocyte globulin, cyclosporin A, methylprednisolone, and granulocyte colony-stimulating factor. *Am J Hematol* 2007; 82(9): 783-786.

Evans RS, Takahashi K, Duane RT, Payne R, Liu C. Primary thrombocytopenic purpura and acquired hemolytic anemia. *Arch Intern Med* 1951; 87(1): 48-65.

Griscelli-Bennaceur A, Gluckman E, Scrobojaci M, Jonveaux P, Vu T, Bazarbachi A, *et al.* Aplastic anemia and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, search for a pathogenetic link. *Blood* 1995; 85(5): 1354-1363.

Hall S, Rosse W. The use of monoclonal antibodies and flow cytometry in the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1996; 87(12): 5332-5340.

Locasciulli A, Bruno B, Rambaldi A, Saracco P, Dufor C, Finelli C, *et al.* Treatment of severe aplastic anemia with antilymphocyte globulin, cyclosporine and two different granulocyte colony-stimulating factor regimens: a GITMO prospective randomized study. *Haematologica* 2004; 89(9): 1054-1061.

Mora L, Jiménez R, Jiménez E, Ramón M, Carrillo J, Sáenz G. Incidencia y etiología de la anemia en la población infantil de Costa Rica. *Sangre* 1979; 24: 277-285.

Mortazavi Y, Merk B, McIntosh J, Marsch J, Schesenmeier H, Rutherford T. The spectrum of PIG-A gene mutations in aplastic anemia/paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: a high incidence of multiple mutations and evidence of a mutational hot spot. *Blood* 2003; 101(7): 2833-2842.

Navarrete M, Jimenez E, Jimenez R, Carrillo J, Mora L, Quesada E. Anemia aplásica adquirida en niños. Análisis de 25 casos. *Bol Med Infantil de México* 1983; 11: 40.

ANEMIA Y OTROS TRASTORNOS HEMATOLÓGICOS EN LOS DESÓRDENES CRÓNICOS

Dr. Miguel A. Rodríguez Pineda
Dra. Lidiette Salazar Palma

ANEMIA DE LA ENFERMEDAD CRÓNICA (AEC)

El término de anemia de la infección fue introducido en 1842 por Catwright y Wintrobe, quienes describieron la masa eritroide disminuida en pacientes con rubéola y fiebre tifoidea, respecto a otros pacientes. En las últimas décadas se encontró este defecto en personas con desórdenes no infecciosos, como la artritis reumatoidea, la enfermedad de Hodgkin y el carcinoma metastásico. Esta anemia se asoció con varias características hematológicas comunes y se le denominó como anemia de los desórdenes crónicos, anemia de la enfermedad crónica, anemia crónica simple y anemia por utilización deficiente de hierro.

Cuando la anemia es secundaria a infecciones e inflamaciones crónicas y a neoplasias primarias o me-

tastásicas, requieren de uno a dos meses para que se presente. Desde el advenimiento de los antibióticos, las infecciones crónicas incapacitantes, como tuberculosis, lepra, sífilis, abscesos pulmonares, endocarditis bacteriana subaguda, osteomielitis y otras, han disminuido notablemente. Sin embargo, no ha sucedido lo mismo con la anemia que complica los desórdenes inflamatorios crónicos, ya que la terapéutica disponible en estos casos es menos eficaz que los antibióticos. Este tipo de anemia es la más común en el paciente hospitalizado.

Los pacientes con infecciones o procesos inflamatorios crónicos o afecciones malignas, desarrollan una anemia de leve a moderada pero persistente, que no responde al tratamiento y que solo mejora cuando lo hace la enfermedad subyacente.

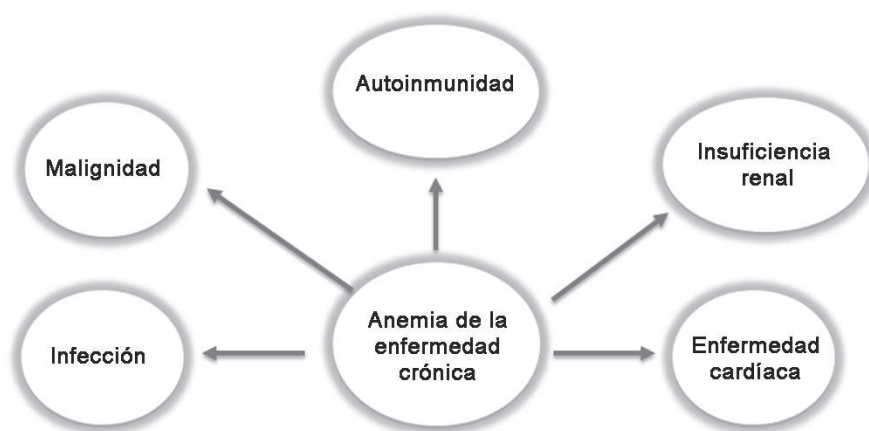


Figura N° 1. Causas de anemia de la enfermedad crónica.

Patogénesis

La hepcidina es una hormona polipeptídica, que se sintetiza en el hígado y en menor cantidad en adipocitos y macrófagos; juega un papel importante en la regulación del hierro y su distribución. La función más importante de esta hormona es unirse a la ferroportina, una proteína considerada como el principal canal de eflujo del hierro y que inhibe la salida de este elemento de sus principales sitios de almacenaje (macrófago y el

hepatocito), al igual que la salida del ión del enterocito duodenal. Actualmente, se considera que además de la ferroportina, la hepcidina actúa también a través del transportador de metales divalentes-1 (DMT-1).

En general, se puede afirmar que en la anemia de la enfermedad crónica lo que existe es un déficit funcional de hierro, como se observa en la Figura N° 2 y en la Figura N° 3.

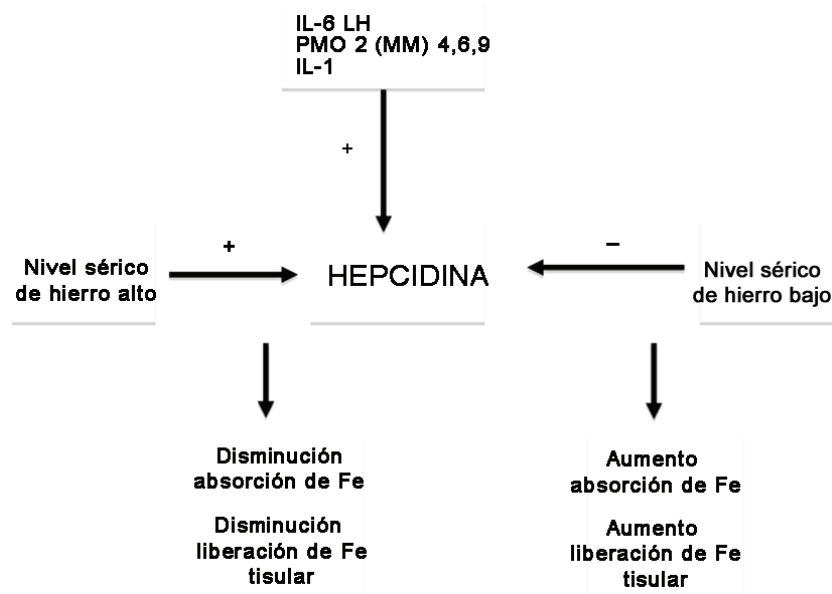


Figura N° 2. Fisiopatología de la anemia de la enfermedad crónica (redistribución del hierro).

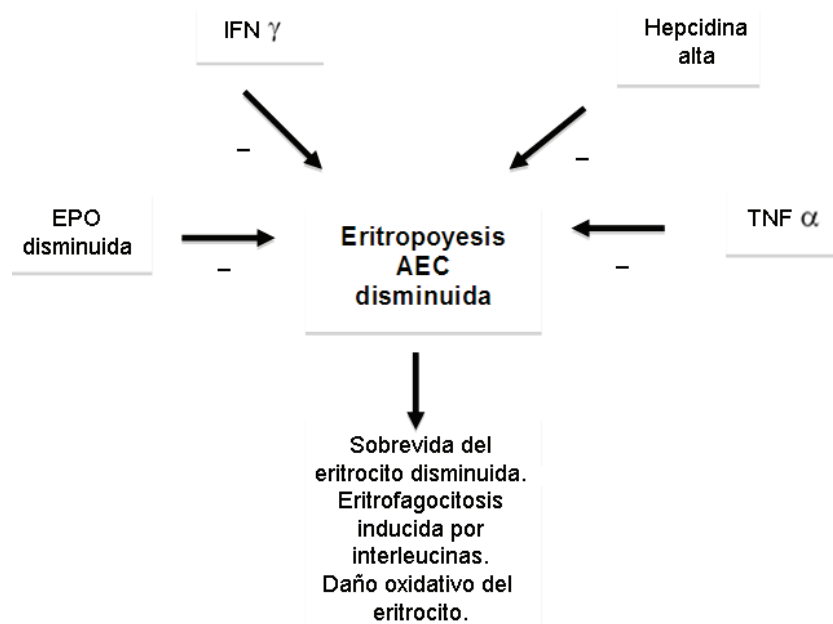


Figura N° 3. Fisiopatología de la anemia de la enfermedad crónica.

Las principales causas de este tipo de anemia son:

- γ Aumento moderado de la destrucción de los glóbulos rojos, secundaria a la estimulación de la actividad fagocítica de macrófagos.
- γ Eritropoyesis frenada para compensar su destrucción. La disminución de la disponibilidad de hierro limita la eritropoyesis, a pesar de que el contenido total de hierro del organismo sea normal.
- γ Deficiencia relativa de eritropoyetina.
- γ Respuesta alterada de la médula ósea a la eritropoyetina.

En cuanto a las manifestaciones clínicas, estas se relacionan con una anemia leve a moderada que complica la enfermedad de fondo. La anemia se describe tradicionalmente con los siguientes hallazgos de laboratorio:

- γ Anemia normocítica-normocrómica o moderadamente microcítica, con un VCM normal o ligeramente disminuido; también puede presentarse hipocromía con un HCM menor a 26 fl. La hipocromía antecede a las microcitosis.
- γ Cifra de reticulocitos normal.
- γ Cifra de ferritina sérica elevada (implica un aumento primario de la síntesis de apoferritina por parte de las células hísticas y el incremento de la acumulación de hierro como ferritina en los macrófagos).
- γ Reducción del hierro sérico, el índice de saturación y la capacidad total de fijación de hierro (CT-FFeS), características diagnósticas más concretas y constantes de la anemia de los procesos crónicos.
- γ Macrófagos de la médula ósea contienen mayor cantidad de hierro.

Diagnóstico

El diagnóstico se establece utilizando varios parámetros:

1. Anemia leve o moderada.
2. Inicia como normocítica normocrómica y puede convertirse en microcítica.
3. Reticulocitos disminuidos, característica de la anemia arregenerativa.
4. Marcadores inflamatorios positivos: neutrofilia, monocitosis, trombocitosis, proteína C reactiva aumentada y VES aumentada.
5. Hierro sérico disminuido.
6. Porcentaje de saturación de la transferrina disminuido.
7. Transferrina normal o disminuida, a diferencia de la carencia de hierro, donde se encuentra aumentada.
8. Ferritina aumentada.
9. Receptor de la transferrina sérica aumentado (se cree que esta podría ser la mejor prueba diagnóstica, pero esto no se ha validado aún), y hasta el momento la prueba diagnóstica de primera línea es el aspirado de médula con tinción de Perls).

Se propone como mejor índice diagnóstico la proporción entre la concentración del receptor de la transferrina soluble y el logaritmo de la concentración de ferritina (sRTF/log ferritina).

Diagnóstico diferencial de la anemia de enfermedad crónica:

- a. Anemia dilucional en pacientes con enfermedades neoplásicas avanzadas.
- b. Supresión medular inducida por fármacos o hemólisis del mismo origen.

- c. Anemia ferropriva.
- d. Anemia de la insuficiencia renal crónica.
- e. Anemia mieloptísica producida por infiltración medular de carcinoma o linfoma.
- f. Anemia por trastornos endocrinos.

ANEMIA DE LA INSUFICIENCIA RENAL

La mayor parte de los pacientes con insuficiencia renal crónica (IRC) presentan anemia. Al parecer existe una gran dependencia entre la magnitud de la uremia y el grado de la anemia. Por lo general, a concentraciones de nitrógeno ureico superiores a 100 mg/dl, el hematocrito es menor al 30%. Igualmente, en relación directa con el flujo renal y el aclaramiento de creatinina.

Las causas que producen esta anemia son:

1. Eritropoyesis disminuida.
2. Hemólisis.
3. Hemorragia, hematuria.
4. Deficiencia de hierro y folatos por la hemodiálisis.

La depresión de la eritropoyesis es multifactorial y está influenciada por el déficit de producción de eritropoyetina en primera instancia. Sin embargo, se describen otras causas, como aumento en la lisis eritrocitaria por cambios en las vías metabólicas como el Shunt de las Pentosas, la ATPasa de la membrana eritrocítica y en la estabilidad del glutatión. En estos casos no hay deficiencia de la enzima G6PD, pero los eritrocitos son altamente sensibles a drogas oxidantes.

La deficiencia de hierro se relaciona con el sangrado o la pérdida de sangre en el proceso de la hemodiálisis. El folato es una sustancia dializable, por lo que fácilmente se pierde en la diálisis, sobre todo cuando esta es frecuente.

Los pacientes nefrópatas pueden presentar púrpura y sangrado a nivel gastrointestinal o ginecológico. Cuando se presenta la trombocitopenia, rara vez explica el sangrado espontáneo; sin embargo, en la mayoría de los casos se observan anomalías de la adhesividad y agregación plaquetaria y en la retracción del coágulo, lo que puede explicar la tendencia al sangrado.

La anemia que se presenta en estos casos, por lo general, es normocítica normocrómica, con reticulocitos normales o bajos. En estos pacientes puede encontrarse un bajo número de equinocitos, acantocitos y queratocitos; los dos últimos son característicos en el síndrome urémico hemolítico. La médula ósea muestra falta de hiperplasia eritroide.

ANEMIA POR HEPATOPATÍA CRÓNICA

Esta anemia es frecuente en personas con padecimientos como cirrosis y hepatoesplenomegalia congestiva. En estos casos la anemia se debe, entre otras causas, al aumento del volumen plasmático; por lo general, no es muy intensa, a menos que se complique con deficiencia de hierro, folatos o vitamina B₁₂.

Los eritrocitos pueden ser normocíticos, macrocíticos o microcíticos hipocrómicos. Los últimos se presentan cuando hay pérdida crónica de sangre debida a la irritación gastrointestinal o ruptura de várices esofágicas. También se observa una hemólisis ligera o moderada; en dicho caso se relaciona a macrocitosis.

La anemia del paciente hepatópata tiene varias causas fisiopatológicas, las cuales se indican en las figuras N° 4 y N° 5.

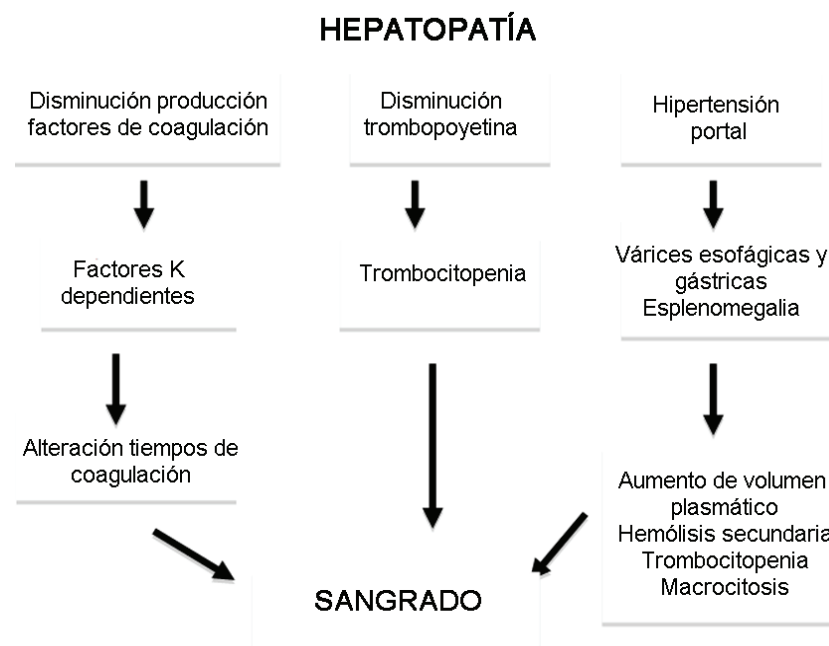


Figura N° 4. Causas de la anemia por hepatopatía crónica.

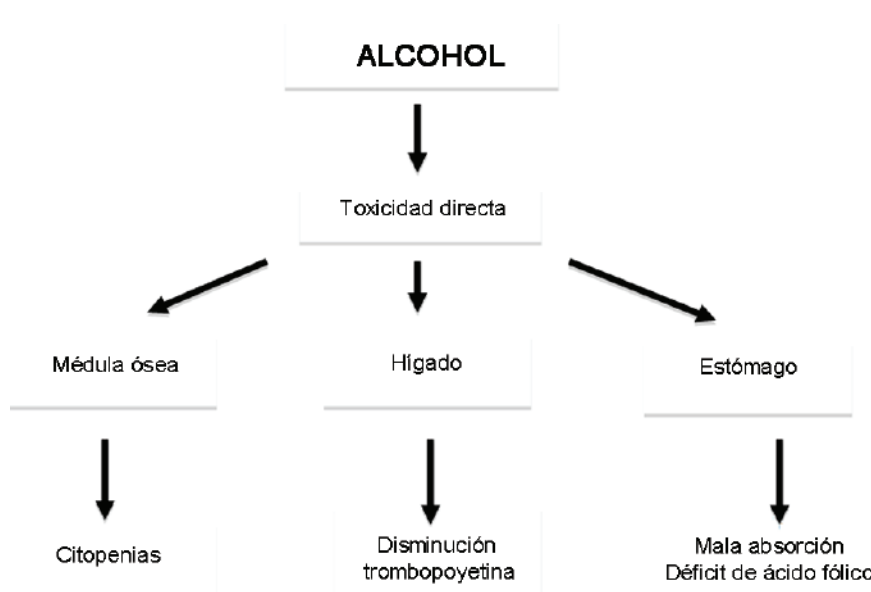


Figura N° 5. Otras causas de la anemia por hepatopatía crónica.

Posterior a un episodio etílico intenso, en algunos casos se presenta fiebre, hepatomegalia, ictericia de predominio indirecto y lipemia, sin esplenomegalia. La cifra de reticulocitos es elevada, por una hemólisis súbita. Al analizar la médula ósea hay hiperplasia eritroide. A este cuadro se le denomina Síndrome de Zieve. Estos pacientes padecen de una hepatitis asociada a la ingesta de alcohol, pero no tienen cirrosis avanzada.

Entre las alteraciones de la morfología de glóbulos rojos es frecuente la presencia de codocitos. En pacientes con Síndrome de Zieve, pueden observarse al frotis acantocitos y células con incremento de colesterol de la membrana, sin aumento de lecitina.

ANEMIA DE LOS DESÓRDENES ENDOCRINOS

Anemia del hipotiroidismo (mixedema)

Esta anemia se presenta como una adaptación al relativo exceso de oxígeno en los tejidos, ocasionado por el estado hipometabólico característico del hipotiroidismo. En estos casos la anemia puede ser:

- Normocítica-normocrómica (hipotiroidismo no complicado).
- Microcítica-hipocrómica.
- Macrocítica de tipo megaloblástico

La anemia más frecuente del mixedema es por deficiencia de hierro, condicionado por la frecuencia de menorragias en mujeres hipotiroideas y por la alta incidencia de aclorhidria gástrica resistente a la histamina, lo cual dificulta la absorción de hierro de los alimentos.

La deficiencia de folatos es común en estos casos, como consecuencia de dieta pobre o mala absorción. Se dice que en el mixedema es frecuente la anemia perniciosa, condicionada por anticuerpos anticélulas parietales, pero estudios sobre el efecto de reacciones cruzadas entre anticuerpos antitiroglobulina y factor intrínseco y células parietales, no son concluyentes.

Anemia de la disfunción adrenal

En la enfermedad de Addison (hipofunción de la corteza suprarrenal) es común una anemia moderada de tipo normocítico-normocrómico, que a veces se enmascara por una disminución concomitante del volumen plasmático. En algunos casos hay anticuerpos anticélulas parietales, lo que condiciona la deficiencia de vitamina B₁₂. La anemia cede al tratamiento con corticoesteroides.

Anemia de la disfunción gonadal

En varones con hipofunción gonadal, los niveles de hemoglobina son similares al de las mujeres, debido a una disminución de los niveles de andrógenos, los cuales, en dosis farmacológicas, estimulan la eritropoyesis (incrementan la producción de eritropoyetina y mejoran su efecto en la médula).

Anemia del hipopituitarismo

La remoción del lóbulo anterior de la hipófisis origina una anemia muy similar a la de la tiroidectomía; una situación parecida se presenta en el hipopituitarismo.

ANEMIA DEL PACIENTE CARDÍOPATA

El paciente cardíopata posee varios factores que pueden desencadenar una anemia. Entre estos se encuentran los asociados a los medicamentos que consumen para tratar su problema y a la falla cardíaca propiamente dicha.

Los pacientes cardíopatas tienen dentro de sus tratamientos el uso de la aspirina, que suele ser una causa importante de sangrado digestivo. Aunado a esto, a pesar de que la angiotensina II induce a hipoxia a nivel glomerular, estimulando la producción de eritropoyetina y favoreciendo la producción de eritrocitos, el uso de los inhibidores de angiotensina puede favorecer la anemia.

Por otra parte, el fallo cardíaco y la disminución de la fracción de eyección reducen el flujo renal, induciendo a falla renal asociada con disminución de la eritropoyetina.

Finalmente, cabe mencionar que la falla cardíaca es un proceso mediado por citokinas, como la IL-1, la IL-6 y la FNT, las cuales, como se explicó anteriormente, favorecen a la redistribución del hierro mediado por la hepcidina, induciendo a la anemia de la enfermedad crónica.

AEC Y DEFICIENCIA DE HIERRO

Estos dos trastornos, muy frecuentes, tienen en común un dato de laboratorio, que es la disminución del hierro sérico. Las implicaciones clínicas de uno y otro trastorno son muy distintas y por ello es importante considerar la forma en que el médico distingue cuál de los dos procesos está presente en el sujeto hipoferrémico. En casos de deficiencia de hierro, la capacidad plasmática de unión a dicho mineral (valor de la transferrina) suele aumentar y ser normal o baja en AEC, pero la cifra no es fiable para distinguir

entre uno y otro trastorno. En los dos es pequeña la saturación porcentual de la transferrina. En promedio, es menor en la deficiencia de hierro que en la AEC, aunque existe una franja amplia de traslape entre las gamas de valores, de modo que esa cifra no es útil para distinguir ambos procesos. Se necesita una valoración precisa de las reservas de hierro, que no existen en las deficiencias de este mineral y que están normales o aumentadas en la AEC. En el pasado las reservas se estimaban sobre bases morfológicas, al teñir el material de aspiración o de biopsia de médula ósea para identificar el hierro. En la actualidad, para este fin se mide la ferritina sérica. Con algunas excepciones de importancia, la concentración de dicha sustancia es directamente proporcional a las reservas de hierro, de manera que cada nanogramo por mililitro de ferritina sérica refleja de 8 a 10 mg de hierro almacenado (o 120 µg de hierro en los depósitos, por kilogramo de peso corporal). Con pocas excepciones, la hipoferritinemia es signo diagnóstico de deficiencia de hierro. En la AEC la ferritina sérica es normal o alta. El incremento de dicha sustancia en la AEC puede ser mayor del que sería explicable por el aumento en las reservas de hierro.

En ciertas enfermedades relacionadas con la AEC, como la artritis reumatoide, la deficiencia de hierro coexiste con la AEC. En estos casos, la ferritinemia puede ser intermedia entre la concentración baja que se encuentra en los casos de deficiencia de hierro y la normal o alta que se encuentra en la AEC. Cuanto mayor sea la ferritinemia, menor probabilidad habrá de que exista deficiencia de hierro junto con AEC. Varios autores han señalado que la deficiencia de hierro es poco factible si la ferritinemia excede de 50 o 60 ng/ml.

A continuación se muestran algunos valores de ferritina sérica que pueden ser de utilidad (Cuadro N° 1). Sin embargo, se debe aclarar que las concentraciones indicadas deben servir de guía y no de regla, porque como se mencionó, existen zonas comunes (traslape) entre las gamas de valores. La coexistencia de deficiencia de hierro y AEC se corrobora por el estudio de las reservas de médula ósea o por la respuesta a la ferroterapia. Cuando se sospechan los dos diagnósticos conviene hacer un lapso de prueba con administración de hierro ingerible y, por supuesto, buscar la causa de deficiencia de este mineral.

Cuadro N° 1. Valores de ferritina sérica	
Ferritina sérica (ng/ml)	Diagnóstico probable
<20	Deficiencia de hierro
20 – 50	Deficiencia de hierro y AEC
>50	AEC

Nota: los valores de referencia varían con los diferentes métodos.

Manejo de la AEC

1. Por tener una presentación leve o moderada, usualmente no requiere intervención.
2. El tratamiento de la causa subyacente es la mejor manera de controlar esta anemia.
3. Cuando el paciente se encuentra sintomático o la anemia es severa, se pueden utilizar las siguientes herramientas terapéuticas:
 - a. Transfusión solo en casos de anemia severa, donde el paciente presente riesgos cardiovasculares. Se debe considerar que este tratamiento expone a aloinmunización y transmisión de agentes infecciosos.
 - b. Factor estimulante de eritropoyesis (eritropoyetina). Está indicada cuando los niveles de EPO se ubican en límites inferiores de lo normal. Se debe considerar como un efecto adverso

la trombosis. Está contraindicado en pacientes con cáncer de mama, cabeza y cuello, así como en personas con cáncer de pulmón de células no pequeñas.

BIBLIOGRAFÍA

- Anand I. Pathophysiology of the anemia in heart failure. *Heart Fail Clin* 2010; 6(3): 279-288.
- Anand IS. Anemia and chronic heart failure implications and treatment options. *J Am Coll Cardiol* 2008; 52(7): 501-511.
- Cullis JO. Diagnosis and management of anaemia of chronic disease: current status. *Br J Haematol* 2011; 154(3): 289-300.
- Goodnough LT, Nemeth E, Ganz T. Detection, evaluation and management of iron-restricted erythropoiesis. *Blood* 2010; 116: 4754-4761

Lichtman Marshall A, Beutler E, Kipps T, Williams WJ. Hematología. 6 ed. Edición en español. Madrid: Marbán Libros S.L.; 2005.

Maes K, Nemeth E, Roodman GD, Huston A, Esteve F, Freytes C, *et al.* In anemia of multiple myeloma, hepcidin is induced by increased bone morphogenetic protein 2. *Blood* 2010; 116(18): 3635-3644.

Weiss G, Goodnough LT. Anemia of chronic disease. *N Engl J Med* 2005; 352: 1011-1023.

Dr. German Sáenz Renauld

INTRODUCCIÓN

El síndrome hemolítico es el resultado de un acortamiento de la vida media eritrocitaria, que produce una destrucción acelerada de glóbulos rojos y un esfuerzo regenerativo del sistema eritropoyético medular, para compensar las demandas aumentadas. Sin embargo, este proceso puede no originar anemia si la médula ósea está funcionando sin ningún impedimento, ya que tiene capacidad para incrementar la producción de eritrocitos de cinco a ocho veces más de lo normal (36-64 g de Hb/día). Entonces, a menos que la eritropoyesis esté deprimida por alguna razón, la anemia hemolítica se caracteriza por tener la hemólisis y la eritropoyesis aumentadas.

Varios y diferentes mecanismos patogénicos pueden causar una disminución en la supervivencia de los eritrocitos. Básicamente, estos mecanismos se clasifican como de tipo intracorpúscular y extracorpúscular. Los efectos intracorpúsculares, que son intrínsecos del eritrocito producido por el paciente, originan una muerte celular prematura en su propia circulación; esto mismo sucede si se transfunden a un receptor normal compatible. Los factores extracorpúsculares, por su parte, son distintos, por cuanto forman parte del medio ambiente en que se encuentran los eritrocitos: por ello, cuando eritrocitos de personas normales compatibles son transfundidos a quien padece fenómeno hemolítico

extracorpúscular, estos también serán destruidos prematuramente; mientras que si los eritrocitos del paciente con un desorden hemolítico extracorpúscular se transfunden a un receptor normal, tendrán una supervivencia normal.

Por lo general, los defectos intracorpúsculares son congénitos, por causa de algún desorden hereditario, y los defectos extracorpúsculares son adquiridos, casi siempre producto de alguna enfermedad asociada u otro desorden. En algunos pacientes, la anemia hemolítica es el resultado de una combinación de anormalidades intra y extracorpúsculares. Dentro de estas se encuentra el favismo, el saturnismo, la anemia megaloblástica, la hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN) y los efectos causados por infección o una droga oxidante.

Entre los hallazgos de laboratorio que pueden destacarse en el fenómeno hemolítico se encuentran el daño eritrocítico (morfología), la supervivencia eritrocítica disminuida, el aumento de los productos del catabolismo de la Hb, el incremento compensatorio en la producción de Hb (reticulocitosis) y, ocasionalmente, las crisis aplásicas.

En el Cuadro N° 1 se muestra la clasificación de las enfermedades hemolíticas, de acuerdo a lo indicado en los párrafos anteriores.

Cuadro N° 1. Clasificación práctica de las anemias hemolíticas

Por defectos intracorpúsculares:

- Membranopatías.
- Eritroenzimopatías.
- Hemoglobinopatías estructurales.
- Síndromes talasémicos.
- Defectos combinados: anemia megaloblástica, anemia ferropriva y desórdenes displásicos del eritrón.

Por defectos extracorpúsculares:

Cuadro N° 1. Clasificación práctica de las anemias hemolíticas

- Anemias inmuno hemolíticas: autoinmunes e isoimunes.
- Anemia hemolítica microangiopática y otras causadas por injuria física o térmica a los eritrocitos.
- Hemólisis oxidativa (anemia hemolítica por cuerpos de Heinz). Por exposición a químicos exógenos o drogas.
- Hemólisis esplenomegálica: hiperesplenismo.
- Anemia hemolítica causada por alteraciones de lípidos de la membrana: acantocitos, anemia hemolítica de células en espuela, anemia hemolítica por fosfolipasas bacterianas.

ERITROCINÉTICA EN ANEMIA HEMOLÍTICA

Relación entre hemólisis, respuesta medular a la hemólisis y anemias hemolíticas

La médula ósea, trabajando a una sexta u octava parte de su capacidad máxima, logra mantener el equilibrio con la destrucción normal de los eritrocitos. Cuando el grado de destrucción de estos se incrementa, la médula ósea normal, estimulada por la eritropoyetina, aumenta la salida de sus eritrocitos proporcionalmente. La proporción normal entre los precursores granulocíticos y los eritrocitos en la médula (G:E) es alrededor de tres a uno, que se reduce cuando aparece la reacción eritroblástica.

Cuando la demanda de células nuevas aumenta, el patrón normal de la médula se altera y la reacción eritroblástica es mayor: la grasa desaparece y la médula ósea se transforma en hiper celular. En los estados hemolíticos crónicos (drepanocitosis, esferocitosis), los espacios medulares activos se expanden por los huesos largos, adelgazando la capa cortical y ensanchando el espacio de la cavidad medular; como resultado, se generan cambios óseos característicos de la anemia hemolítica drepanocítica, como la modificación del cráneo, que adquiere un aspecto de peine o estriado, lo cual se observa fácilmente en las radiografías.

Cuando la médula ósea responde al estímulo, con una sobreproducción de elementos eritroides, los eritrocitos pueden ser destruidos a una velocidad seis veces mayor que la normal, sin que se desarrolle anemia. No obstante, inevitablemente el paciente se transformará en anémico cuando presente evidencias claras de hemólisis aumentada, como se observa en las "crisis hemolíticas", o cuando la médula ósea detenga la producción de los glóbulos rojos de manera brusca, como se observa en las "crisis aplásicas".

El patrón de la anemia hemolítica compensada con episodios de crisis se ve en diferentes tipos de trastornos, como en la esferocitosis hereditaria. Si el grado de hemólisis excede persistentemente la disponibili-

dad de la médula para regular el equilibrio, el paciente presentará de forma constante una anemia hemolítica descompensada; este es el patrón que se observa en la anemia drepanocítica (HbSS).

Existen ciertas condiciones anémicas en las cuales la médula ósea, en apariencia normal, no responde de manera adecuada a la hemólisis. Tal es el caso de algunos trastornos clínicos (infecciones crónicas, artritis reumatoide, enfermedades malignas), en los que el grado de destrucción de los eritrocitos aumenta discretamente, sin que sea esto suficiente para producir cambios en los diferentes pigmentos del catabolismo de la Hb; pero puede demostrarse el exceso de destrucción por el acortamiento de la sobrevivencia de los eritrocitos marcados *in vitro* con Cr⁵¹. Así, la sobrevivencia de los eritrocitos puede ser de 20 días en lugar de la sobrevivencia normal de 26 días (según el método con Cr⁵¹). Sin embargo, la salida de las células (reticulocitos) de la médula ósea no aumenta para regular esta discreta destrucción. En estos casos, la médula ósea continúa produciendo las células rojas a un ritmo normal, pero pareciera haber un bloqueo parcial de la médula para reutilizar el hierro de los eritrocitos senescentes, por lo que los pacientes desarrollan un moderado tipo de anemia, debida a la destrucción prematura de los eritrocitos. Es erróneo considerar a esas anemias como verdaderas anemias hemolíticas. La condición básica en estos trastornos es una incapacidad de la médula para aumentar la cantidad de eritrocitos, a fin de compensar el moderado aumento en su grado de destrucción.

Por otra parte, en cuanto al conteo de reticulocitos, es importante recordar que este análisis evalúa la capacidad funcional de la médula ósea (eritropoyesis) y que su porcentaje está en relación con la gravedad de la anemia y su corrección, y la real producción medular. De tal forma, un cómputo reticulocitario mayor de 4%, o mejor aún, un índice reticulocitario mayor de tres en una persona que no ha tenido una hemorragia reciente, ni ha recibido terapéutica antianémica, indica que podría haber un desorden hemolítico. Con frecuencia,

el cómputo es mayor de 10%, y algunas veces tanto como 30% o más. El estudio del frotis bien teñido a menudo revela una evidencia sugestiva de proceso hemolítico en forma de células rojas nucleadas, basofilia, punteado basófilo, células en diana, esferocitos y poiquilocitosis importante. La leucocitosis a menudo está presente. Dichas anormalidades en sangre periférica reflejan la hiperplasia medular, que puede comprobarse a través de un mielograma, de tal suerte que la relación media normal G:E, que es de 3,5 como promedio, se torna 1:1 o menor. En algunos pacientes con anemia hemolítica y con una marcada hiperplasia medular, se observan numerosos elementos jóvenes de serie roja (proeritroblastos y eritroblastos basófilos); por eso, la naturaleza de la eritropoyesis puede ser malinterpretada como megaloblástica, en vista de las similitudes morfológicas entre las células jóvenes de ambas series. Por lo tanto, es conveniente el estudio cuidadoso de las células rojas nucleadas más maduras (policromatófilos y ortocromáticos) para lograr la diferenciación. No obstante, en ciertas pacientes la médula ósea puede ser netamente megaloblástica por una deficiencia de folatos, situación que agrava el cuadro anémico hemolítico y da un cuadro de "hipoplasia" medular, al menos por lo que refleja el hemograma (tendencia a pancitopenia).

SIGNOS GENERALES DE HEMÓLISIS

Después de un viaje de cuatro meses a través de la circulación, el eritrocito normal termina su vida y es digerido por los macrófagos. Su muerte se anuncia por cambios celulares de envejecimiento: pérdida de membrana superficial, disminución del contenido acuoso y reducción de la actividad de diversos sistemas enzimáticos. La hemólisis patológica tiene lugar cuando la propia célula es intrínsecamente defectuosa o cuando el medio en el cual circula contiene factores nocivos.

Cuando la duración de la vida del eritrocito solo está ligeramente abreviada, las consecuencias pueden no tener importancia. Por otra parte, en estados hemolíticos graves una vida del glóbulo rojo de solo 1/10 o de 1/20 del período de 120 días, pone a prueba la capacidad de la médula ósea para cubrir las necesidades de eritrocitos a un ritmo suficiente como para asegurar una concentración de hemoglobina circulante compatible con la salud. Esto se refleja en una hiperplasia de eritroblastos. Así, aquella médula normalmente ocupada por grasa, es convertida en tejido celular. Pasan a la circulación reticulocitos jóvenes y a veces eritroblastos. La médula ósea es capaz de aumentar la producción de reticulocitos (normal 20 ml) en grado limitado -entre seis y ocho veces el valor normal (120 a 160 ml)-. Por lo tanto, es posible compensar una reducción en la duración de la vida de los glóbulos rojos que

son 1/6 a 1/8 de la normal. Así pues, el estado hemolítico no se asocia necesariamente con anemia grave. De hecho, el término "hemólisis compensada", antes descrito, se emplea para describir estados hemolíticos que no se asocian con anemia en absoluto.

La hemólisis aguda origina rápida disminución de la masa de eritrocitos, debido a que la médula ósea se encuentra "desprevenida"; también hay un retraso de cuatro a cinco días para que se "eche a andar la maquinaria" como una respuesta a la anemia. Cuando la hemólisis crónica origina anemia, el aceleramiento en la producción de eritrocitos, ya de por sí disminuidos, representa el equilibrio entre la producción y la destrucción en un estado de equilibrio constante. Las limitaciones de la producción pueden causar anemia incluso cuando el grado de hemólisis es moderado. Tal limitación se produce, como ya se mencionó, con otras enfermedades, como estados neoplásicos, inflamatorios o bien, por deficiencia de nutrientes esenciales, en particular hierro y folatos. La crisis aplásica aguda (síndrome de Gaisser) es el desequilibrio más crítico entre la producción y la destrucción: los precursores eritroides desaparecen de forma brusca de la médula y de la circulación. Por fortuna, el período de aplasia en la formación de eritrocitos, probablemente desencadenado por una infección de parvovirus, suele ser de breve duración (7-14 días) y por lo regular hay recuperación. Infecciones similares también pueden interrumpir la eritropoyesis en individuos normales, pero durante el período de paro medular la disminución en el recuento sanguíneo es imperceptible, gracias a la longevidad característica de los eritrocitos normales. En el frotis de sangre periférica teñida con Wright se reconocen los reticulocitos como macrocitos policromatófilos o con basofilia difusa. Los esferocitos son eritrocitos pequeños y redondos, teñidos intensamente, que se observan en diversos estados hemolíticos. Deformaciones regulares e irregulares de la membrana del eritrocito, que forman protrusiones y espinas, y la fractura de algunos eritrocitos en pedazos, sugieren una lesión mecánica o metabólica.

MEMBRANA ERITROCITARIA

La membrana del glóbulo rojo está formada por proteínas incrustadas en lípidos, principalmente fosfolípidos y colesterol. La membrana conserva cierto exceso de área superficial, proporcionándole una forma bicóncava y mandando la hemoglobina a la parte periférica de la célula, que se asemeja a una dona. La conservación de esta forma depende de un gasto energético. La amplitud del área superficial es susceptible de cambio: normalmente disminuye con la edad. Sin embargo, los eritrocitos maduros, que ya son capaces de sintetizar lípidos, pueden sufrir cambios

de volumen e interacción de membrana con el medio externo. Tiene lugar un rápido intercambio pasivo de colesterol libre (pero no colesterol esterificado) entre la membrana y el plasma. Asimismo, tiene lugar un recambio de fosfolípidos, aunque con ritmo mucho más lento. La cantidad de colesterol libre de la membrana puede cambiarse variando el contenido de colesterol libre del medio vecino. Un valor alto originará acumulación en la membrana, lo que aumentará su superficie y volumen. Esto confiere a los eritrocitos una mayor distensibilidad en medios hipotónicos; es decir, que aumenta su resistencia osmótica. La membrana redundante de tales células llenas de colesterol origina el aspecto de célula en diana o dona, en donde la zona de palidez central tiene un "ojo de buey" de hemoglobina depositada (artefacto *in vitro*). A la inversa, la suspensión de eritrocitos en plasma o suero pobre de colesterol libre provocará pérdida de colesterol de la membrana, con disminución de la resistencia osmótica.

El eritrocito es el principal transportador de oxígeno, como combustible para todo el cuerpo. Además de los enlaces fosfóricos ricos en energía del ATP, requiere

energía para efectuar las reducciones bioquímicas que protegen sus propias partes de la desnaturalización oxidativa por este combustible. Existen dos sistemas reductores principales. Uno, que utiliza NADH, conserva los átomos de hierro de la hemoglobina en forma reducida. Esta reducción es mediada por una enzima, la reductasa de la metahemoglobina o diaforasa. El otro sistema reductor conserva en estado reducido los grupos tiol de la célula -de las membranas, las enzimas y la hemoglobina-. Esta vía se encuentra mediada por NADPH, que a su vez acaba trabajando para conservar el glutatión en estado reducido. La glucosa es la única fuente de energía.

DEFORMABILIDAD ERITROCITARIA

El primer determinante de la deformabilidad eritrocitaria es la forma de disco bicóncavo que posee el eritrocito común, lo cual es absolutamente indispensable para el mantenimiento de una deformabilidad normal. El exceso normal de superficie con respecto al volumen hace posible que los eritrocitos pasen a través de canales con una longitud superior a 14 μm , con un diámetro de 2,8 μm (Figura N° 1) o por los canales

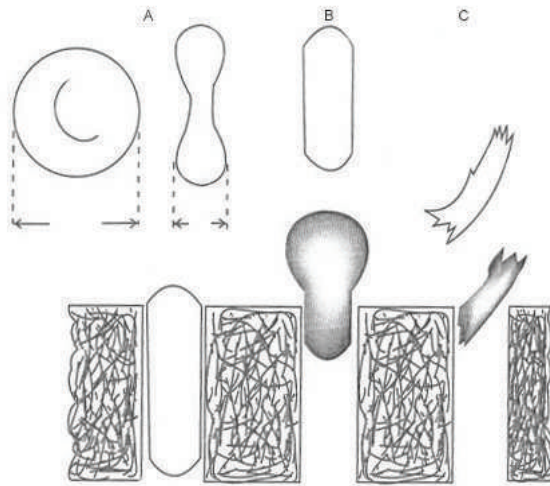


Figura N° 1. Paso de los eritrocitos a través de canales de 28 μm .

más cortos, pero de diámetros menores de 0,5 μm , como los que se hallan en el bazo. Como se expuso, cualquier aumento en el volumen celular o disminución en la superficie implica la producción de una célula más esférica, que es menos capaz de doblarse o deformarse para atravesar los estrechos canales de la microcirculación. Por ello, los esferocitos, tal como se encuentran en la esferocitosis hereditaria o en la anemia hemolítica inmune, poseen una supervivencia limitada, debida a la crítica relación entre superficie y volumen, como se observa en la Figura N° 2.

El tercer mecanismo fisiopatológico mayor que determina pérdida de la deformabilidad eritrocitaria es la inflexibilidad aumentada de la membrana por sí misma, por causa de una disminución de ATP intracelular y/o por aumento de Ca^{++} . Existen distintas vías fisiopatológicas que producen un aumento de la rigidez celular y su fragmentación, que puede formar parte de dicha fisiopatología o ser consecuencia de esta (Figura N° 2). La vía A ilustra el hecho de que las hemoglobinas anormales, como la SS o la CC, en situaciones de tensión baja de oxígeno o de hiperosmolaridad, respectivamente, pueden

incrementar la viscosidad o la rigidez intracelular, con la consiguiente pérdida de deformabilidad celular. Las proyecciones apendiculares de las células falciformes son suficientemente rígidas como para fragmentarse al atravesar la microcirculación, y dicha rotura puede ocasionar un escape de cationes y lisis coloidosmótica de la célula. La vía B ilustra la posible consecuencia de la formación intracelular de cuerpos de Heinz. Si están presentes en suficiente cantidad, estas inclusiones intracelulares rígidas limitan el paso de las células a través de ciertas regiones, como la circulación en la pulpa esplénica. Si solo existen algunos precipitados intracelulares, estos son extraídos de las células cuando pasan por el bazo. Las consecuencias morfológicas resultantes de ello son las células en lágrima o célula que parecen tener una mordedura y que se han hecho más rígidas a causa de la lesión; por eso, queda comprometida su posterior supervivencia. Los traumatismos extrínsecos, como los que se ven en casos de hemólisis por prótesis valvular cardíaca o en síndromes de hemólisis microangiopática, producen fragmentación celular, lo que indudablemente conduce al subsiguiente acortamiento de la vida media de las células afectadas. En la extensión de sangre suele evidenciarse fragmentación excesiva y esquizocitosis. La vía D ilustra la forma de fragmentación que se ve atacada por anticuerpos, esto es, fagocitosis parcial con el aumento consiguiente de la esfericidad de la porción

de la célula que queda sin fagocitar. Finalmente, en la vía E puede verse la transformación esferocitaria que, se sabe, ocurre con depleción de ATP y en la esferocitosis hereditaria, incluso en presencia de niveles normales de ATP.

El ATP eritrocitario es un determinante crítico de su supervivencia, porque si el ATP está presente en suficiente concentración previene el cambio esferocitario y además, porque mantiene la fluidez interna de la célula y la deformabilidad intrínseca de esta y de la membrana. Así pues, cualquier defecto enzimático que impida el mantenimiento de unos niveles críticos de ATP, conduce al acortamiento de la vida media eritrocitaria.

Valoración en el laboratorio de la pérdida de deformabilidad eritrocitaria

La primera y más simple prueba de alteración en la deformabilidad eritrocitaria puede obtenerse, a menudo, con el examen detenido de la extensión de sangre periférica. Cualquier desviación significativa en la morfología eritrocitaria de la célula normal bicóncava de contornos lisos, identificable con la tinción de Wright en virtud del área de palidez central, debe sugerir la posibilidad de alteraciones fundamentales de las propiedades físicas celulares, que van a predisponer a un acortamiento de su vida media.

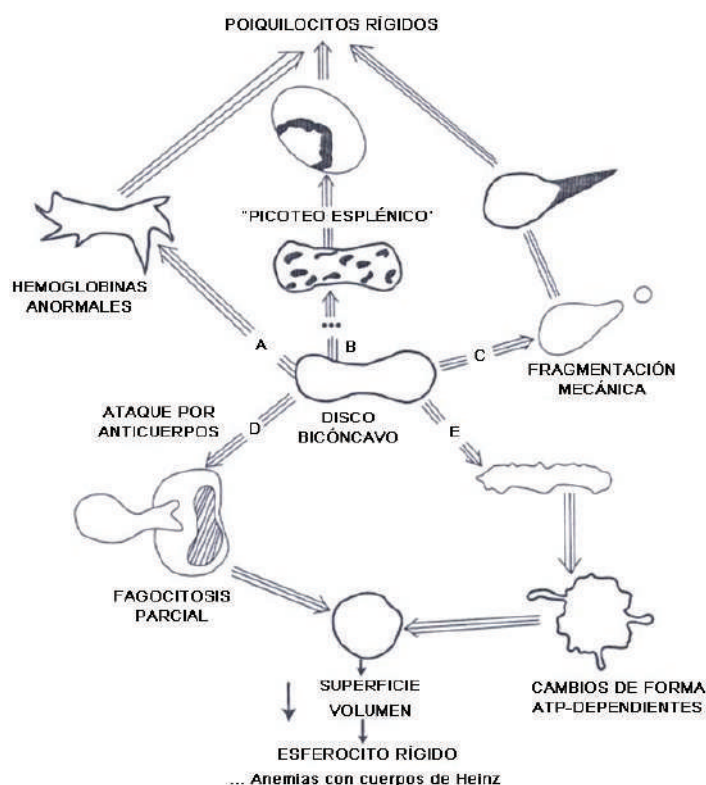
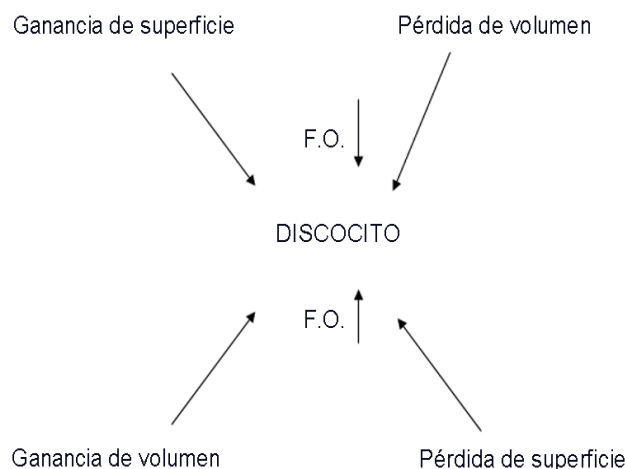


Figura N° 2. Patogenia de la rigidez y fragmentación eritrocítica.

Como se ha mencionado, la identificación morfológica de esferocitosis significativa permite la predicción de acortamiento de la vida media eritrocitaria y debe estimular un estudio de todas las posibles causas de esferocitosis, las cuales implican pérdida de membrana, como se observa en los diferentes tipos hereditarios de esferocitosis, así como en los adquiridos (anemia hemolítica inmune, anemia hemolítica con cuerpos de Heinz, daño mecánico y térmico, toxinas); esta pérdida también se llevará a cabo en los acantocitos y en las células parecidas. La presencia de crenocitos de formas esferocíticas, de esquizocitos, de acantocitos (células en espuela) y de estomatocitos, derivados todos ellos de las distintas anomalías fundamentales, implican pérdida de la deformabilidad celular normal. De la misma manera, la presencia de fragmentos con contenido hemoglobínico o de grandes células que parecen perder material, sugiere que está ocurriendo un proceso hemolítico importante; a la vez, el hecho

de que dichas células mantengan su forma anormal y extraña, en vez de readoptar un contorno liso, hace pensar que su contenido, sus membranas o ambos, han sido también alterados.

Por otra parte, la prueba de fragilidad osmótica, aunque basada en muchas suposiciones, proporciona una medida de la relación que existe entre la superficie y el volumen de los eritrocitos que se estudian y, por lo tanto, de su capacidad de deformación y de pasar a través del bazo. De esa forma, si el volumen de los eritrocitos en el plasma es normal o cercano a la normalidad, un aumento de la fragilidad osmótica indica que existe una disminución de la superficie. Por el contrario, una fragilidad osmótica disminuida implica un aumento de la relación superficie/volumen, tanto si las células ya existen así en el plasma, como si se han hinchado en el curso de la técnica empleada para el estudio, como se observa a continuación:



En cuanto a las pruebas de filtrabilidad eritrocitaria, estas proporcionan una medida mecánica de la deformabilidad eritrocitaria. Si la filtrabilidad celular está disminuida -lo que indica una pérdida de la deformabilidad-, debe utilizarse entonces la prueba de fragilidad osmótica. Si está aumentada, el defecto debe ser atribuido a la formación de esferocitos, lo cual debería ser sugerido por la extensión de sangre. Las anomalías en el estado físico de la hemoglobina intracelular, no obstante, originan una disminución de la fragilidad osmótica. Este fenómeno se ilustra en la Figura N° 2.

CATABOLISMO DE LA HEMOGLOBINA

La ictericia es un signo frecuente de hemólisis. Muchas veces es subclínica y no puede descubrirse si no es por medición química de la concentración sérica de bilirrubina. El grado de ictericia nunca es intenso; la concentración sérica total de bilirrubina mayor de 6 mg

por 100 ml sugiere función inadecuada del hígado o de su sistema de drenaje biliar, pues la capacidad del hígado para captar y conjuguar la bilirrubina es inmensa. La ictericia hemolítica incluye principalmente aumento de bilirrubina no conjugada (es decir, fracción de reacción indirecta), la cual circula en el plasma unida a la albúmina plasmática y, por lo tanto, no se pierde con la orina. Al atravesar el hígado, la bilirrubina es convertida en el diglucurónido hidrosoluble (fracción conjugada o de reacción directa) y casi toda es eliminada con la bilis. Parte de esta bilirrubina conjugada es reabsorbida y pasa a la circulación enterohepática; la mayor parte es reducida por las bacterias cólicas, formando urobilinógeno, que también sufre circulación enterohepática. En la hemólisis, la salida de pigmentos biliares en el intestino está aumentada en proporción directa del grado de desintegración del heme y, por ende, de la intensidad del proceso hemolítico. El urobilinógeno de la orina también se encuentra incrementado como consecuencia del aumento de

la circulación enterohepática, pero por esta vía solo se elimina una pequeña proporción del total de los cambios bioquímicos observados en la hemólisis intravascular y extravascular (Cuadro N° 2).

Los glóbulos rojos circulantes no son las células más pequeñas de la sangre, pero sí son las más simples desde los puntos de vista anatómico y funcional. Las células rojas carecen de núcleo y de otras organelas (mitocondrias, por ejemplo). El no poseer núcleo les impide la síntesis de proteínas, pues para esto hace

falta la información contenida en el ADN; aunado a esto, la falta de cadena respiratoria mitocondrial les impide la utilización del oxígeno, de modo que la producción de energía descansa en la vía glicolítica, que se lleva a cabo sin utilización del oxígeno. Su metabolismo, entonces, les da un rendimiento energético muy pobre. Esto constituye una paradoja metabólica, ya que siendo los eritrocitos las células encargadas del transporte del oxígeno, no lo pueden utilizar para su propio beneficio.

Cuadro N° 2. Hemólisis - Anormalidades bioquímicas		
Prueba	Hemólisis ligera o moderada (Extravascular)	Severa (Intravascular)
Haptoglobinas	↓	↓↓
Hemopexina	↓	↓↓
Hb plasmática	Normal	↑
Hb orina	Normal	↑
Metahemalbúmina	Normal	↑
Bilirrubina sérica	Normal	↑
Bilirrubina orina	Normal	↑
Urobilinógeno fecal	↑	↑↑
Urobilinógeno orina	↑	↑↑
Hemosiderinuria	Normal	↑↑

En los eritrocitos seniles, las vías metabólicas se van tornando muy pobres ante la imposibilidad de renovar las enzimas que van desapareciendo; la hemoglobina que se oxida ya no se reduce rápidamente y la membrana va perdiendo sus propiedades elásticas. Estas células ya cumplieron su ciclo de vida útil y deben ser destruidas. Esta tarea es ejecutada por el sistema mononuclear fagocítico.

La destrucción de los eritrocitos viejos marca el inicio del catabolismo de la hemoglobina. Esto significa que, en condiciones normales, la ubicación intracelular que ocupa la hemoglobina la protege contra los procesos oxidativos irreversibles que actúan después de que la proteína es liberada de los glóbulos rojos, pues durante la vida útil del eritrocito la hemoglobina sufre muy poca degradación.

En el plasma sanguíneo hay una pequeña cantidad de hemoglobina, la cual deriva de la hemólisis intravascular, es decir, de los eritrocitos que se destruyen mientras se encuentran en la circulación. Su concentración es muy pequeña; se calcula que cada 100 ml de plasma contienen entre 1 mg y 4 mg de hemoglobina.

Las haptoglobinas (Hp) capturan la hemoglobina circulante. Se trata de glicoproteínas del tipo de las α_2 -globulinas que se encuentran en el plasma del

hombre y de otros mamíferos, con la única función aparente de formar un complejo estable y soluble con la hemoglobina (Hb-Hp). Las haptoglobinas son moléculas simétricas que, como la hemoglobina, consisten en dos pares de cadenas o subunidades: 2α y 2β . Las diferencias estructurales que existen entre las haptoglobinas encontradas en los seres humanos radican en las cadenas alfa. Así, las haptoglobinas constituyen efectivos marcadores genéticos humanos, que existen en tres variedades fenotípicas conocidas como 1-1, 2-1 y 2-2. La formación del complejo Hb-Hp implica el establecimiento de enlaces no covalentes, primero entre las cadenas alfa de la hemoglobina y las cadenas beta de la haptoglobina. Es probable que la haptoglobina se una más fácilmente a los dímeros alfa-beta de la hemoglobina, que al tetrámero completo.

Las haptoglobinas contenidas en 100 ml de plasma normal humano pueden combinarse con 50 mg a 150 mg de hemoglobina. Esta cifra es casi 100 veces más grande que la concentración normal de la hemoglobina en el plasma. Cuando la hemoglobina marcada y unida a la haptoglobina se administra a personas sanas directamente en el torrente circulatorio, se puede demostrar que el complejo desaparece en forma rápida de la circulación, calculándose que tiene una vida media de 10 a 30 minutos. El complejo es secuestrado por los órganos del sistema reticuloendotelial, con una

velocidad proporcional a sus respectivos flujos sanguíneos: en el hígado más rápidamente que en la médula ósea y en esta, a su vez, más que en el bazo.

En los desórdenes hemolíticos el veloz recambio de la hemoglobina, junto a la rápida eliminación del complejo Hb-Hp por el sistema reticuloendotelial, conduce a una disminución (o a desaparición) de la haptoglobina plasmática, lo que también ocurre en los recién nacidos y en pacientes con enfermedad hepatocelular (Cuadro N° 2).

La administración de hemoglobina marcada a animales desprovistos de haptoglobina, ha demostrado que cerca del 50% es eliminada por los riñones, mientras que la mayor parte del remanente es tomada por los órganos reticuloendoteliales, casi en la misma proporción que el complejo. En forma alternativa, la captura de la hemoglobina por el hígado, la médula ósea y el bazo puede ser debida a la unión con la haptoglobina que se sintetiza in situ. También se ha demostrado que el hígado, si bien puede no ser el único, sí es el mayor productor de haptoglobinas.

La hemoglobina que circula en forma libre en el plasma se convierte irreversiblemente en metahemoglobina, por oxidación del átomo de hierro divalente. Algunas condiciones, como la saturación parcial con oxígeno, favorecen la formación de metahemoglobina. Además, en el plasma puede haber sustancias oxidantes que favorecen esta transformación. El ferrihem (hem oxidado o metaHb) se disocia de la metahemoglobina de manera más fácil que el hem de la hemoglobina.

La hemopexina (Hpx), una glicoproteína de peso molecular de 70 KD, se encuentra normalmente en el plasma de las personas adultas, en una concentración que oscila entre 50 y 100 mg/dl. Un mol de ferrihem se une a un mol de hemopexina. Como la haptoglobina, la hemopexina del plasma se consume en los estados hemolíticos, pero su ausencia en el plasma o en el suero es un índice menos efectivo de hemólisis, puesto que solo ocurre en ciertos tipos de enfermedad hemolítica grave.

El hígado es el principal órgano para la remoción del complejo Hb-Hp de la circulación. Los hepatocitos están involucrados en la captura del complejo, en contraste con el otro complejo, el Hb-Hp, el cual es removido por las células de Kupfer. El ferrihem es entonces convertido en bilirrubina. A diferencia del complejo Hb-Hp, que se cataboliza in toto después de su captura en el sistema reticuloendotelial, la apohemopexina (la parte proteica de la hemopexina) puede ser liberada al plasma una vez que descarga el grupo hem que transporta en el parénquima hepático.

El ferrihem también forma un complejo estable con la albúmina, el cual se conoce como metahemalbúmina o methemalbúmina. De modo que, como la hemopexina, la albúmina humana se une al ferrihem en una relación molar de 1:1. La aparición de methemalbúmina y la desaparición de la hemopexina plasmática, generalmente indican hemólisis grave y esto no ocurre sino hasta que se ha agotado la haptoglobina. Los grupos hem de la methemalbúmina circulante son posiblemente transferidos a la apo-hemopexina, una vez que esta ha liberado los suyos en el hepatocito.

El complejo Hb-Hp es muy grande como para que pueda ser eliminado por los riñones. En los estados hemolíticos en los cuales la haptoglobina plasmática ha sido consumida, la hemoglobina circulante penetra en los glomérulos. La permeabilidad glomerular a la hemoglobina excede en mucho a la de la albúmina, una proteína de peso molecular semejante. La posible explicación de este fenómeno es que la hemoglobina, un tetrámero, se disocia de forma reversible en dímeros alfa-beta. Estos dímeros, por su menor peso molecular, probablemente pasan al filtrado glomerular. La hemoglobina filtrada es luego reabsorbida por los túbulos proximales, por un proceso semejante a la pinocitosis. Las cadenas polipeptídicas y los grupos hem se catabolizan de manera rápida, mientras que el hierro del hem entra a un fondo de almacenamiento localizado en la célula tubular. Estas células tienen una capacidad para captar hemoglobina similar a la que tienen por la glucosa los aminoácidos y el fosfato. Si la cantidad de hemoglobina en el filtrado sobrepasa esta capacidad, ocurre entonces el fenómeno de hemoglobinuria, esto es, aparición de hemoglobina en la orina.

OTROS ASPECTOS FISIOPATOLOGICOS DE LA HEMÓLISIS

En los últimos años se ha dirigido gran parte de la atención sobre la bioquímica patológica de la célula roja en las distintas hemoglobinopatías y en los déficits enzimáticos del ciclo de Embden-Meyerhof, los cuales inducen una falta de mantenimiento del adenosíntrifosfato (ATP) eritrocitario y provocan defectos del "shunt" de los pentosafosfatos que interfieren con la propiedad de la célula roja de mantener el glutatión y resistir la exposición a los agentes oxidantes. Ha quedado claro que la fisiopatología del acortamiento de la vida media eritrocitaria que se relaciona con estos defectos bioquímicos subyacentes, se puede comprobar mejor si se estudia en términos de propiedades físicas alteradas del eritrocito. La deformabilidad celular, antes expuesta, es una propiedad esencial que le permite al eritrocito, cuyo diámetro mayor excede normalmente de 8 μ m, atravesar durante 120 días capilares con un diámetro

que oscila entre 3 y 12 μm ; así también, introducirse por las trabéculas esplénicas, en cuya membrana basal existen pequeñas aberturas que miden 0.5 μm de diámetro y que separan la trabécula del sinusoide.

Otro parámetro celular de importancia crítica es la adhesividad de la membrana, es decir, la predisposición para adherirse a otro eritrocito, a un macrófago o a la pared de un vaso. La formación de pilas de monedas o agregación eritrocitaria, estimulada por el fibrinógeno y la gammaglobulina, e inhibida por la albúmina y la alfa globulina, es una forma débil de interacción eritrocitaria, que suele acontecer en condiciones de estasis, pero que se corrige fácilmente en las condiciones normales del flujo circulatorio. Las macroglobulinas patológicas pueden producir una agregación inespecífica que conduce a la oclusión de los pequeños vasos. Los grupos de ácido siálico de la membrana celular cargados negativamente, actúan inhibiendo la agregación eritrocitaria; pero estas fuerzas repulsivas pueden ser superadas por ciertos anticuerpos que producen aglutinación al reaccionar con los antígenos específicos del eritrocito, con la consiguiente captura de estos eritrocitos por parte del bazo y del hígado. En los procesos microangiopáticos, como ocurre en la hemólisis del síndrome urémico o en carcinomas metastáticos, el pequeño vaso alterado por depósitos de fibrina puede inducir a la formación de puentes de unión entre los eritrocitos y las paredes vasculares, con la consiguiente fragmentación de dichos eritrocitos, tras ser golpeados por el torrente circulatorio (Figura N° 1).

Al ser discocítica la forma normal del glóbulo rojo, se han descrito otras formas en las que una alteración de la razón área de superficie/volumen (A/V) constituye el factor mayor. La razón A/V puede verse reducida por circunstancias que disminuyen A o incrementan V, lo que origina una conversión del discocito o esferocito a estomatocito. Por otro lado, si la razón A/V se ve incrementada por factores que aumentan A o reducen V, entonces el exceso de A provoca la formación de codocitos. La A puede perderse tanto interna como externamente. Cuando el discocito se ve sujeto a depleción de ATP, a la acumulación de Ca^{++} , a un pH alcalino, al ataque por fosfolipasas, a la exposición de lisofosfatidil-colina o a aniones anfipáticos, emite al exterior proyecciones de membrana y se convierte en un equinocito reversible. Si el ataque continúa, más y más material de membrana se ve atrapado en las espinas equinocíticas, y puede perderse parte de esas proyecciones o quedar como vacuolas exocíticas. El resultado de todo eso lleva a la creación del esfero-equinocito, el cual eventualmente puede adquirir de manera irreversible el estado III de esfero-equinocito. A la inversa, cuando el discocito es expuesto a un pH ácido o a cationes anfipáticos, se transforma en un

estomatocito irreversible. La deformabilidad intrínseca del eritrocito es el producto de la interacción de dos compartimentos: la membrana en sí misma y la viscosidad interna del citosol. Esta última depende de sus dos principales constituyentes: la Hb (30% de la célula) y el agua (67%). La relación entre el agua celular y la Hb es lo que se expresa como CHCM. La Hb es extremadamente soluble, pero a las concentraciones que existen en el eritrocito (30 g/dl), la solución acuosa de esta se asemeja a un gel, y cuando la CHCM se incrementa por encima de 30 g/dl la viscosidad interna sube hiperbólicamente.

En la esferocitosis hereditaria, los eritroblastos y los reticulocitos son normales. Sin embargo, conforme la célula madura se pierde membrana por vesiculación (forma particular de fragmentación). La formación de estos esferocitos, que más a menudo son estomatocitos -tal y como se evidencian por contraste de fases-, son dañados tan selectivamente que su alteración estructural es detectada por los cordones esplénicos de la pulpa roja. Este fenómeno es contrario a otras formas de esferocitosis -como los provocados en la anemia hemolítica autoinmune y en la hemólisis microangiopática-, donde otros órganos con contingente del sistema macrófago mononuclear (hígado, por ejemplo) participan activamente en la remoción de células esferocíticas. Los esferocitos tienen incrementada la CHCM, lo cual sugiere que en adición a la pérdida de membrana, también pierden agua celular. Entonces, la forma esferocítica y el incremento de la viscosidad interna se combinan para hacer aún más proclive su destrucción.

ALGUNAS CONDICIONES CLÍNICAS QUE PLANTEAN LA EXISTENCIA DE ENFERMEDAD HEMOLÍTICA

Un paciente tiene trastorno hemolítico cuando presenta anemia y reticulocitosis, en ausencia de sangrado y de tratamiento específico. Para establecer la existencia de un estado hemolítico, el diagnóstico y la intensidad del proceso se determinan con mediciones del número de reticulocitos, valoración de la bilirrubina sérica, de hemoglobina en plasma y orina, y de hemosiderina en orina, junto con el examen morfológico cuidadoso de la sangre periférica y de la médula ósea. Una segunda etapa de pruebas hemolíticas puede después precisar o establecer el trastorno fisiopatológico celular o extracelular (Cuadro N° 3). Incluye medidas de fragilidad osmótica y emplea una serie graduada de soluciones hipotónicas de NaCl; la autohemólisis de eritrocitos incubados in vitro en condiciones estériles; el estudio en busca de defectos enzimáticos; análisis del tipo de hemoglobina; pruebas de factores inmunológicos, como la de la antiglobulina de Coombs, aglutinina de frío y pruebas de hemolisina de frío; así como

pruebas de los eritrocitos sensibles al complemento de la hemoglobinuria paroxística nocturna (pruebas de hemólisis con sacarosa, hemólisis ácida o de la inulina). La morfología de los glóbulos rojos o el estudio de las circunstancias clínicas (como el hecho de que

el paciente sufra cirrosis o uremia) por si solo puede brindar rápidamente la clasificación fisiopatológica. En el Cuadro N° 4 se muestran algunos indicadores que ayudan al diagnóstico de anemia hemolítica.

Cuadro N° 3. Pruebas de laboratorio usadas en el diagnóstico de enfermedad hemolítica
Para indicar disminución compatible con hemólisis:
- Haptoglobinas plasmáticas. - Hemopexina plasmática. - Supervivencia del eritrocito (Cr04).
Para indicar hemólisis intravascular:
- Hemoglobina plasmática. - Metehemalbúmina plasmática. - Hemoglobinuria. - Hemosiderinuria. - DHL: isoenzima DHL- 2 (también H, extravascular).
Para identificar enfermedad hemofílica inmunitaria:
- Prueba antiglobulina (Coombs). Antigama -para identificar IgG en el eritrocito-. - Anticomplemento - para identificar complemento (C3) en el eritrocito-. - Título de crioaglutininas.
Para verificar la presencia de hemoglobinuria paroxística nocturna:
- Prueba de la inulina. - Prueba de hemólisis con sacarosa. - Prueba de hemólisis ácida (Ham).
Para verificar esferocitosis hereditaria:
- Fragilidad osmótica. - Autohemólisis. - Lisis del glicerol (Vettore, Zanello).
Para verificar eritroenzimopatía:
- Prueba de escrutinio del cianuro-ascorbato. - Estudio de piruvato quinasa. - Estudio de G-O-PD.

Cuadro N° 3. Pruebas de laboratorio usadas en el diagnóstico de enfermedad hemolítica
Para identificar hemoglobinopatía:

- Índices (VCM, HCM).
- F.O. al 0,36% de NaCl; 0,50% y 0,55% de NaCl.
- Electroforesis de la Hb para detectar Hb S, C, E, etc.
- Pruebas de solubilidad para HbS.
- Cuantificación de fracciones de Hb (A2 F, Bort, H, etc.).
- Cuerpos de inclusión y pruebas de estabilidad de la Hb (Hbs inestables).

Cuadro N° 4. Indicadores para el diagnóstico de anemia hemolítica

- a) Datos de hemólisis como causa principal de anemia:
 1. Ausencia de pérdida de sangre.
 2. Índice de producción de reticulocitos: si es mayor de tres sugiere fuertemente hemólisis; si hay anemia grave de iniciación reciente o si hay enfermedad coexistente capaz de suprimir la médula ósea, el índice de reticulocitos puede ser de 2,0 a 3,0.
 3. Hemoglobinemia, hemoglobinuria o hemosiderinuria: dato suficiente de hemólisis, pero no necesario para el diagnóstico, y con frecuencia ausente.
- b) Base clínica:
 1. Edad en que se inició.
 2. Antecedentes familiares.
 3. Enfermedades concomitantes (por ejemplo, enfermedades de la colágena, linfoma).
 4. Uso de medicamentos (como alfontildopa, penicilina a altas dosis, fármacos oxidantes).
- c) Datos físicos:
 1. Ictericia.
 2. Esplenomegalia.
- d) Frotis de sangre:
 1. Macroцитs policromatófilos (reticulocitos).
 2. Eritroblastos.
 3. Forma de los eritrocitos (por ejemplo, esferocitos, esquizocitos, drepanocitos, acantocitos, etc.).
- e) Pruebas de laboratorio de acuerdo con la información anterior.

En general, el médico piensa en la existencia de un fenómeno hemolítico cuando se presenta en un paciente un descenso inesperado de la cifra de hemoglobina. Si la caída de hemoglobina tiene como causa un problema de producción de eritrocitos, el descenso es lento y gradual (anemia aplásica), dado que se esperaría que cada día desaparecieran de la circulación alrededor de una centésima parte de la cifra original de eritrocitos (tres unidades del índice hematocrito por semana); por lo tanto, ante el descenso

brusco tiene que pensarse que el paciente sangró o que tuvo un fenómeno de hemólisis anormal, como el caso de la anemia hemolítica microangiopática (Cuadro N° 5). Este tipo de anemia intravascular es producto de un daño al endotelio arteriolar o por el depósito de fibrina. La anemia hemolítica y macroangiopática se desarrollan en grandes vasos, donde hay válvulas cardíacas artificiales (aorta) o prótesis intraventriculares; en estas condiciones se produce excesiva turbulencia que provoca daño mecánico.

Cuadro N° 5. Causas de anemia hemolítica microangiopática	
Enfermedades vasculares colágenas:	
•	γ Poliarteritis nudosa.
•	γ Esclerodermia.
•	γ Lupus eritematoso sistémico.
•	γ Granulomatosis de Wegener.
-	Carcinoma diseminado.
-	Coagulación intravascular diseminada.
-	Placenta previa.
-	Púrpura fulminante.
-	Septicemia.
-	Hemangiomas gigantes.
-	Síndrome hemolítico urémico.
-	Hipertensión maligna.
-	Preeclampsia.
-	Rechazo de trasplante renal.
-	Púrpura trombocitopénica trombótica.

Otro dato que hace plantear la posibilidad de enfermedad hemolítica es la presencia de ictericia, ante la cual se sigue el razonamiento ordinario para establecer la diferencia entre ictericia hemolítica e ictericia parenquimatosas o por obstrucción de vías biliares.

Estas consideraciones sobre hemólisis intravascular se pueden apreciar esquemáticamente en las figuras N° 3, N° 4 y N° 5.

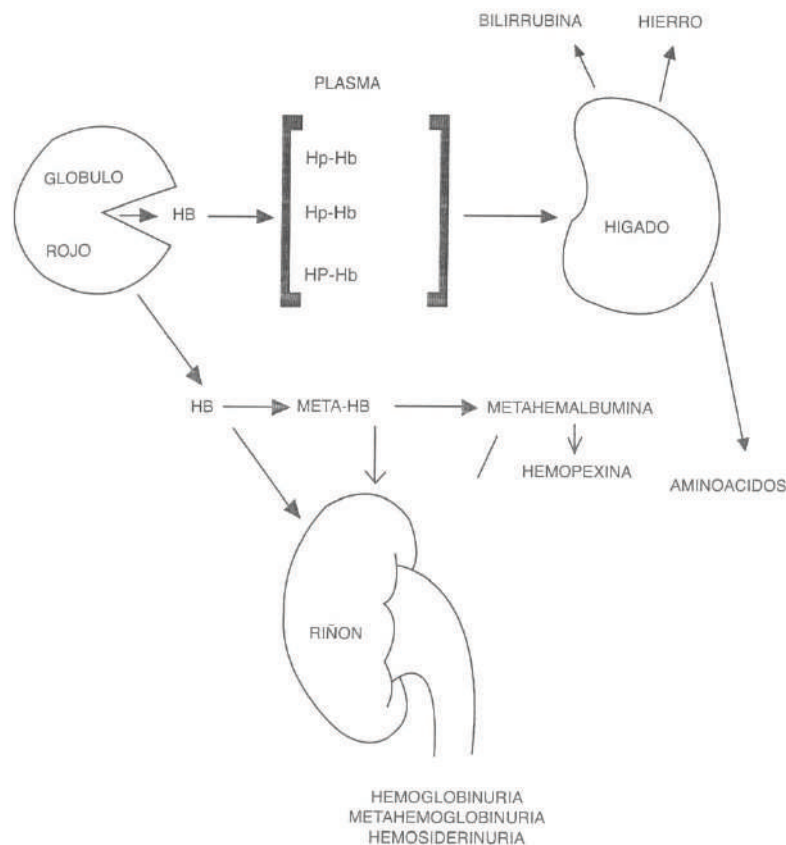


Figura N° 3. Vías metabólicas de la hemoglobina libre producto de una hemólisis intravascular.

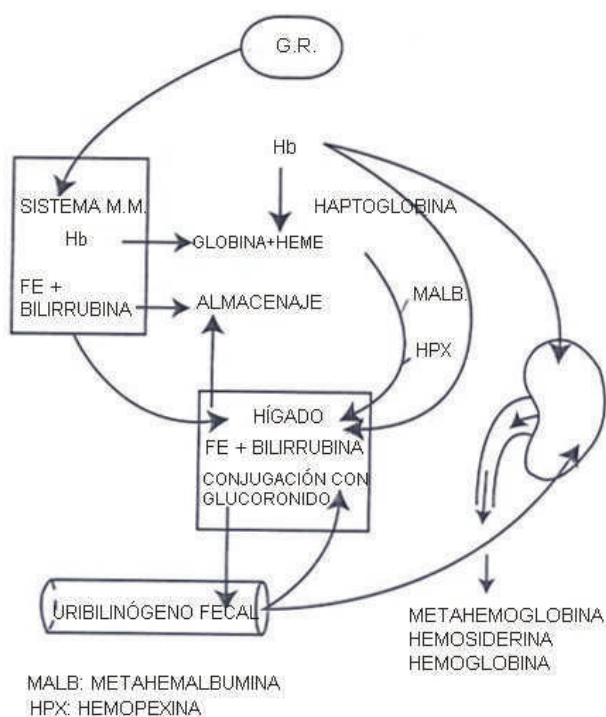


Figura N° 4. Tipos de hemólisis *in vivo*.

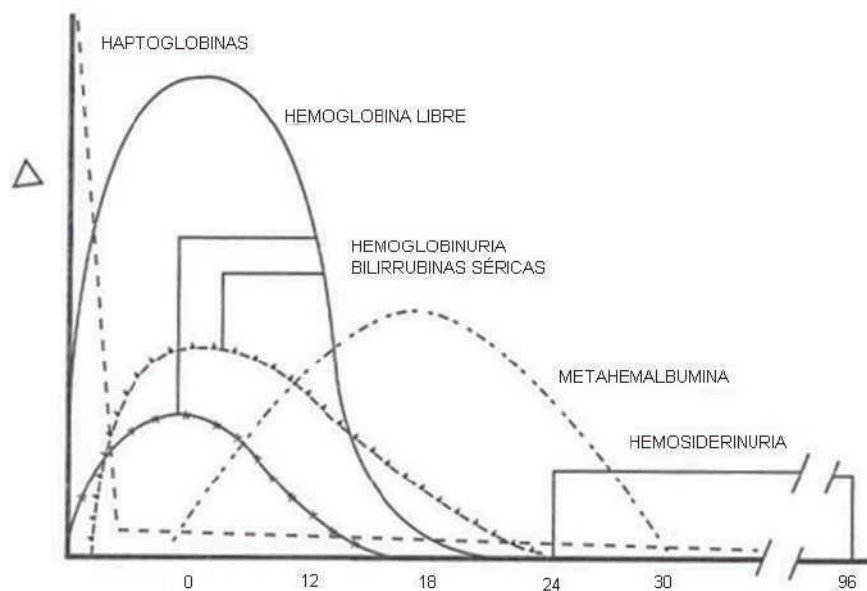


Figura N° 5. Aparición y desaparición de proteínas y pigmentos durante la hemólisis intravascular.

Hay situaciones en las que a pesar de que el paciente no presenta las manifestaciones analizadas previamente, el médico puede tener interés especial en demostrar un fenómeno hemolítico exagerado, como es el caso de los familiares de un paciente con una forma hereditaria de anemia hemolítica. Otro ejemplo lo constituyen los enfermos con insuficiencia renal aguda y/o con púrpura y algunas manifestaciones viscerales

(con el fin de estudiar la posibilidad de púrpura trombocitopénica trombótica, síndrome de Evans y lupus eritematoso diseminado); y, finalmente, el caso de aquellos pacientes con formas de anemia por insuficiencia renal crónica, neoplasia o infección, en los que hubiera interés en valorar la participación del fenómeno hemolítico en la patogenia de la anemia.

En el recién nacido es necesario estudiar la posibilidad de anemia hemolítica cuando hay hidropesía fetal o anemia y cuando la cifra de bilirrubina escapa al máximo permisible para su edad y condición de nacido a término prematuro.

Diagnóstico de enfermedad hemolítica en el recién nacido

La presencia de anemia en el recién nacido es causada, la mayoría de las veces, por hemorragias o por fenómeno hemolítico. Con respecto a la hemorragia, debe recordarse que puede manifestarse al exterior, lo que no da lugar a problemas de interpretación, pero que puede ocurrir lo contrario y pasar totalmente inadvertida. Por otra parte, puede presentarse como una hemorragia lenta y persistente, como en el caso de la transfusión feto-materna o feto-feto. La palidez es común a la anemia hemolítica por incompatibilidad en sistema ABO.

En ninguna forma, la presencia de ictericia durante las primeras 24 horas en el niño recién nacido a término o en el prematuro durante las primeras 36

o 48 horas haría pensar en ictericia fisiológica. La ictericia precoz refiere a un proceso infeccioso como hepatitis, enfermedad citomegálica, rubéola congénita, torulosis, sífilis, septicemia (especialmente por *E. coli*), toxoplasmosis, hemorragia en espesor de los tejidos y desde luego, fenómeno hemolítico exagerado (aunque la ictericia está ausente o es muy leve al nacimiento en anemia hemolítica del recién nacido y aparece poco después).

En cuanto al papel del laboratorio en la determinación de la enfermedad hemolítica del recién nacido, el diagnóstico debe iniciarse desde el embarazo, con la detección de casos de sensibilización, por medio de los estudios que deben formar parte del cuidado prenatal. El producto sospechoso de enfermedad hemolítica severa debe diagnosticarse a través del estudio del líquido amniótico y, en caso necesario, ser tratado. Por último, cuando se demuestre que la madre está sensibilizada a un antígeno de los glóbulos rojos del esposo, y se obtiene en su hijo al nacer una prueba directa de Coombs positiva, se puede afirmar que el niño tiene enfermedad hemolítica del recién nacido (Cuadro N° 6).

Cuadro N° 6. Principales causas de anemia hemolítica en el período neonatal

1. Inmune.
2. Infección.
3. Coagulación intravascular diseminada.
4. Anemia hemolítica macro y micro.
5. Galactosemia.
6. Acidosis respiratoria o metabólica.
7. Desórdenes hereditarios de la membrana del glóbulo rojo (G.R.)
8. Picnocityosis.
9. Deficiencias enzimáticas del G.R.
10. Deficiencia de vitamina E.
11. Hemoglobinopatías.

Aumento de bilirrubina indirecta

El recién nacido tiene una capacidad limitada para conjugarse la bilirrubina indirecta, lo que explica la frecuencia de la llamada "ictericia fisiológica". Sobre la conjugación en la célula hepática pueden influir en forma desfavorable algunas situaciones metabólicas (deshidratación, hipoxia, hipoglicemia) y la administración de algunos medicamentos. También existen otros factores que aumentan la bilirrubina indirecta, como los fenómenos hemolíticos exagerados, las hemorragias en los tejidos y los desórdenes hepáticos.

Como se mencionó, en el recién nacido a término y en el prematuro, no puede considerarse ictericia fisiológica a la que aparece en las primeras 24 horas y 48 horas,

respectivamente. En el recién nacido a término puede esperarse un ascenso hasta de 12 mg/dl de bilirrubina, con tendencia a la normalización hacia el sexto día, y en el prematuro el límite superior sería 15 mg/dl de suero, que se observa hacia el sexto o séptimo día, y tendencia a la normalización en 17 días. Si en los días subsiguientes se rebasa el límite superior señalado, se plantean las siguientes posibilidades: anemia hemolítica, hemorragia en los tejidos, proceso infeccioso, acción de vitamina K, de novobiocina o de otros medicamentos, hipoxia, retraso en la administración de la alimentación, enfermedad de Gilbert o síndrome de Grigler Najjar. En caso de que la anomalía resida en la prolongación del período de hiperbilirrubinemia, se puede pensar en un defecto en el mecanismo de conjugación, lesión hepática, cretinismo, galactosemia

y producto de madre diabética.

La posibilidad de que un proceso hemolítico esté causado por un proceso infeccioso, hace necesario el empleo de los métodos de laboratorio correspondientes.

Diagnóstico de la anemia hemolítica en niños de otras edades

La palidez está presente en todos los pacientes con drepanocitosis, talasemia mayor y anemia hemolítica adquirida (autoinmune), y rara vez ausente en pacientes con esferocitos hereditaria. La ictericia está presente en aproximadamente 80% de los pacientes; su ausencia se nota más o menos en la misma proporción en todos los grupos. La esplenomegalia es constante y muy prominente en los pacientes con talasemia mayor; se aprecia en todas las personas con esferocitosis, con una gran variación en su magnitud, ya que mientras en un paciente el bazo puede rebasar solamente 2 cm del borde costal, en otros puede rebasar 17 cm. Todavía se encuentra crecimiento del bazo en la gran mayoría de los pacientes con anemia SS cuando llegan por primera vez al hospital, para desaparecer con lentitud en el curso del tiempo. Solo un 50% de los casos con anemia hemolítica adquirida (autoinmune) presenta esplenomegalia al momento del diagnóstico, lo que hace pensar en la importancia de la duración del proceso.

En cuanto a las interacciones entre el bazo y los eritrocitos, se debe indicar que estos pasan 120 veces por día por el bazo y que la duración de cada paso es de unos 30 segundos si el glóbulo rojo es sano. Los eritrocitos anormales duran de varios minutos a horas en este tránsito. La pulpa roja esplénica es una fina trampa para eliminar eritrocitos anormales, estructural o metabólicamente, ya que es acídica, hipóxica e hipoglicémica, y hay marcada estasis que favorece el efecto deletéreo de estas condiciones sobre células alteradas. Los eritrocitos son detenidos y/o destruidos en el bazo si hay pérdida de deformabilidad o si poseen proteínas en su superficie (IgG₁, IgG₃, C_{3b}). Ahora bien, la deformabilidad se pierde por un aumento de la viscosidad intracelular (Hbs insolubles, inestables), por pérdida de K⁺ y H₂O, por ganancia de la membrana y por una disminución del área de superficie (esferocitos).

Se encuentra hepatomegalia en todos los pacientes con drepanocitosis y talasemia mayor, y en las dos terceras partes de los sujetos con esferocitosis y anemia hemolítica adquirida. No es raro que se informe sobre la emisión de orina oscura en personas con esferocitosis y con anemia hemolítica adquirida. Es frecuente el retraso en el crecimiento en pacientes con anemia por

HB y con talasemia. En la anemia SS destaca además la presencia de crisis dolorosa y de fiebre.

En los individuos con talasemia mayor la hemólisis es muy severa y permanente. En los casos de esferocitosis y anemia SS, el fenómeno hemolítico anormal es permanente, con crisis de agravamiento de la anemia, a la que se asocian en la anemia SS las crisis dolorosas y febriles antes mencionadas. En personas con deficiencia de la deshidrogenasa de la glucosa-6-fosfato, su situación habitual es aparentemente normal (raza negra), con crisis importantes cuando se exponen a ciertos medicamentos. Algunos pacientes deficientes de esta enzima tienen fenómeno hemolítico crónico moderado (caucásicos: anemia hemolítica crónica no esferocítica).

En cuanto al laboratorio, no es de esperar que el hemograma permita obtener una orientación definitiva en los enfermos en los que el acortamiento de la sobrevida es poco marcado. El cuadro morfológico de regeneración activa que sugiere anemia hemolítica puede presentarse, desde luego, en un paciente con sangrado. Por lo tanto, conviene eliminar esta posibilidad diagnóstica y recordar, además, que en fenómenos hemolíticos exagerados se observan cifras de reticulocitos claramente más altas que en hemorragias. En especial, causan problemas las hemorragias en los tejidos que pueden acompañarse de hiperbilirrubinemia.

Además de estos datos generales, pueden encontrarse deformaciones características de los glóbulos rojos: esferocitos en la esferocitosis hereditaria, en anemia hemolítica autoinmune e incluso, en un porcentaje importante de los pacientes con enfermedad hemolítica autoinmune y en un porcentaje relevante de los sujetos con enfermedad hemolítica del recién nacido por incompatibilidad en el sistema ABO; presencia de drepanocitos en la anemia SS y en la S/ beta talasemia; y presencia de microcitosis, codocitosis, poiquilocitosis, leptocitosis muy pálidos y eritroblastemia marcada, en talasemia mayor.

Aunque desafortunadamente no siempre la ausencia de haptoglobina corresponde a la existencia de anemia hemolítica, hay acuerdo general en que es un buen método para detectar hemólisis exagerada y, en especial, es útil para resolver problemas de diagnóstico diferencial planteados por la existencia de una cifra elevada de bilirrubina indirecta de difícil interpretación. Por lo tanto, el hemograma, la determinación de bilirrubinas, del urobilinógeno fecal, el estudio de sobrevida de los eritrocitos y la determinación de haptoglobinas, permiten concluir que un paciente tiene enfermedad hemolítica. Aun así, el

estudio de la sobrevida permite establecer, además, una clasificación patogénica, y la biometría hemática en algunos pacientes permite avanzar en forma importante desde el punto de vista nosológico. Podría señalarse también que el hemograma y las bilirrubinas son, por su sencillez, los recursos básicos a los que se añaden otros a medida que son necesarios.

Cuando se sospecha esferocitosis hereditaria, se recurre al estudio clínico de los familiares y la revisión de sus preparaciones de sangre. Se hace un estudio de autohemólisis, se analiza la resistencia de los glóbulos rojos a la acción de soluciones hipotónicas y en forma sistemática se practica prueba directa de Coombs. Cuando se plantea el diagnóstico de hemoglobinopatía se practica la investigación de HbS, mediante la prueba de solubilidad y, simultáneamente, se practica el estudio electroforético de la hemoglobina. Con el fin de incluir en el estudio a las hemoglobinas inestables, se investiga la estabilidad de la solución de hemoglobina al calor o al alcohol isopropílico, y se buscan cuerpos de Heinz en sangre fresca y en sangre incubada 48 horas en condiciones estériles. En el momento oportuno, se realizan estudios similares en los familiares del paciente.

Tratándose de talasemia se recurre a la cuantificación de hemoglobina fetal y a la electroforesis de la hemoglobina, con posterior cuantificación de la HbA₂. En el caso de las anemias hemolíticas sin esferocitosis, son fundamentales el estudio de la autohemólisis, la investigación de cuerpos de Heinz, la prueba de la estabilidad del glutatión y una prueba de escrutinio para la deshidrogenasa de la glucosa-6-fosfato, entre otros. De ser necesario, se recurre al estudio de otras enzimas del glóbulo rojo.

En el caso de un paciente con hemoglobinuria se comienza por plantearse si tiene relación o no con transfusión sanguínea; en caso positivo se recurre al estudio minucioso de grupos sanguíneos y anticuerpos del receptor y del donador. En caso negativo, el estudio incluye demostración de hemoglobinemia y de hemoglobinuria, con la investigación de hemosiderinuria y las pruebas de Donath Landsteiner, de Ham, de Hartman y de la inulina.

BIBLIOGRAFÍA

Brodersen R. Bilirubin transport in the newborn infant reviewed with relation to kernicterus. *J Pediat* 1980; 96: 349-356.

Cashore WJ, Stern L. Neonatal hyperbilirubinemia. Symposium on the newborn. *Pediatr Clin North Am* 1982; 29: 1191-1203.

Celle P, Lichtman MA. Anemia con reticulocitosis: trastornos hemolíticos. En: Lichtman MA. *Hematología Clínica*. México: Interamericana; 1983. p. 51-87.

Dacie JV, Lewis SM. *Practical hematology*. 5 ed. London: Churchill Livingstone; 1975.

Ersley AJ, Gabuzda TG. *Hematología aspectos fisiopatológicos*. 2 ed. México: Nueva Interamericana; 1981.

Gordon-Smith EC. Inherited haemolytic anaemia. En: Hoffbrand AV, Lewis SM. *Postgraduate hematology*. 2 ed. London: William Heinemann Medical Books Ltd.; 1981. p. 145-189.

Jandl JH. Hemolytic anaemias I, II. En: Beck W. *Hematology*. 2 ed. Massachusetts: MIT Press; 1977. p. 225-268.

Nelson PA. Erythrocytic disorders. Hematology and coagulation. Basic methodology. En: Henry JB. *Clinical diagnosis and management by laboratory methods*. Philadelphia: W.B. Saunders Co.; 1979. p. 964-1035.

Ortega JJ. Anemias hemolíticas. *Anales de Pediatría Continuada* 2004; 2(1): 12-21.

Rosse W. The acquired hemolytic anaemias. En: Hoffbrand AV, Lewis SM. *Postgraduate hematology*. 2 ed. London: William Heinemann Medical Books Ltd.; 1981. p. 229-268.

Williams WJ, Beutler E, Erslev AJ, Lichtman MA (editores). *Hematology*. 3 ed. New York: McGraw Hill Co.; 1983.

HEMÓLISIS POR MEMBRANOPATÍAS Y ERITROENZIMOPATÍAS

Dr. Walter E. Rodríguez Romero
Dra. Sandra M. Boza Oreamuno

MEMBRANOPATÍAS

Generalidades de la membrana eritrocítica

La membrana del eritrocito posee las características básicas de cualquier sistema de mosaico fluido. Es rica en colesterol, fosfolípidos y proteínas, en una proporción equitativa. Hacia la parte externa de la membrana se proyectan gran cantidad de glicoproteínas. Además de la membrana como tal, existe un sistema proteico complejo que conforma el citoesqueleto de la membrana y que posee la función de dar soporte, resistencia y elasticidad a la célula, así como permitir el anclaje de la membrana celular.

En la membrana, los fosfolípidos se orientan con sus cabezas polares hacia la parte externa y hacia el citoplasma, dejando las colas hidrofóbicas en contacto interno. La distribución de estos fosfolípidos es asimétrica, ya que la fosfatidilcolina y la esfingomielina se disponen en la parte externa, mientras que los aminofosfolípidos se ubican en la lámina interna de la bicapa.

Las proteínas se dividen en dos grupos. Por un lado, aquellas que forman parte de la membrana celular y que son denominadas integrales, ya que penetran la bicapa

lipídica; y por otro lado, las periféricas, que forman parte del citoesqueleto. Dentro de las integrales se ha identificado el transportador de aniones (banda 3) y las glicoforinas, que son proteínas de transmembrana. En cuanto a las proteínas que conforman la malla del citoesqueleto, las principales son la espectrina, la ankirina, la actina, la banda 4.1, entre otras. Este citoesqueleto, además de lo citado, se relaciona con la movilidad de antígenos de membrana, la endocitosis y la fusión con agentes externos y la membrana. Cabe destacar que la membrana del eritrocito funciona ligada íntimamente con el citoesqueleto. En la Figura N° 1 se muestra un esquema básico de esta interacción.

La proteína periférica más abundante es la espectrina (dímero). Esta se une a la banda 4.1 y a la actina, y en conjunto se ligan a la glicoforina C, adhiriendo la membrana al citoesqueleto. Además, la espectrina se une con la ankirina y esta última se ancla a la banda 3 (estabilizada por la 4.2). Otras proteínas periféricas descritas recientemente son la tropomiosina, la tropomodulina, la aducina y la dematina, las cuales se asocian a la espectrina y a la actina.

La importancia del citoesqueleto radica en que al dar soporte y elasticidad a la célula, cualquier defecto en alguna de las proteínas por trastornos hereditarios, va

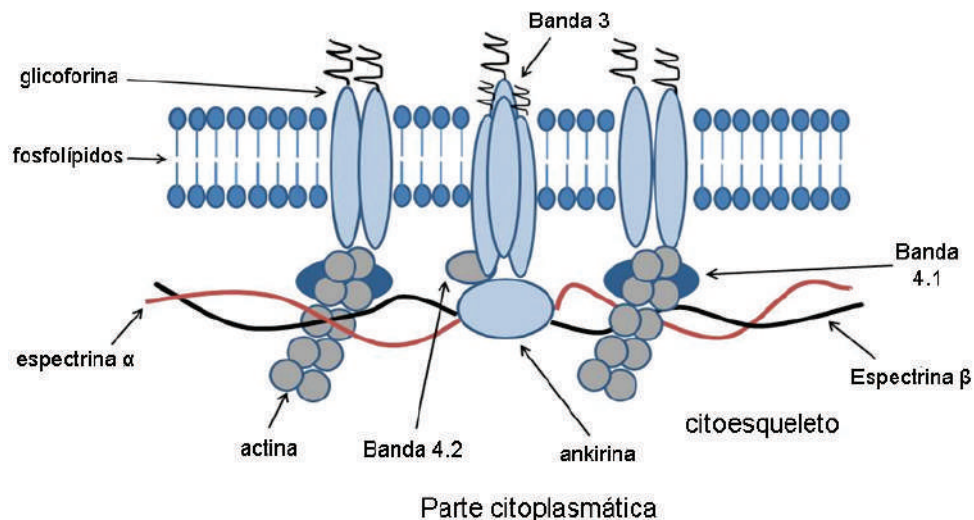


Figura N° 1. Esquema de la membrana y el citoesqueleto del glóbulo rojo.

a desencadenar una desestabilización de la membrana del glóbulo rojo, generando las membranopatías. A manera de ejemplo, tanto la espectrina, como la ankirina y la banda 4.2 se asocian a cuadros de esferocitosis hereditaria.

Defectos en cualquiera de las interacciones de esas proteínas de la membrana (espectrina actina-banda 4.1, dímero-tetrámeros de espectrina, espectrina-ankirina-banda 3) debilitan el citoesqueleto y comprometen sus funciones. Diversos desórdenes moleculares en la estructura e interacciones de las distintas proteínas, que resultan en una inestabilidad del citoesqueleto, exhiben una vía común en la destrucción del eritrocito: pérdida de fragmentos de membrana, disminución de la razón área de superficie/volumen, disminución de la deformabilidad celular, entrapamiento esplénico y muerte eritrocítica.

Existen tres desórdenes principales de los eritrocitos humanos, con defectos de membrana, que desarrollan anemia hemolítica por el mecanismo anteriormente expuesto: esferocitosis hereditaria, eliptocitosis hereditaria y la piropoiquilocitosis hereditaria. Estas patologías cursan con cuadros típicos de hemólisis extravascular, donde el eritrocito debe deformarse para pasar por los pequeños sinusoides esplénicos y, además, es sometido a condiciones especiales de estrés. Allí estas células son inspeccionadas por los macrófagos del bazo, y por tener alteraciones de membrana, con elasticidad disminuida, son picoteadas y finalmente, después de varios pasajes por el bazo, son destruidas.

En el Cuadro N° 1 se resumen las principales alteraciones de membrana y las proteínas asociadas.

Cuadro N° 1. Principales membranopatías y su asociación con proteínas del citoesqueleto	
Membranopatía	Proteína afectada
EH, ELH, PPH	α -espectrina
EH, ELH, PPH	β -espectrina
EH	Ankirina
EH, OSA	Banda 3
ELH	Banda 4.1
EH	Banda 4.2
EH	Glicoforina C

EH: Esferocitosis hereditaria; ELH: Eliptocitosis hereditaria; PPH: Piropoiquilocitosis hereditaria; OSA: Ovalocitosis del sudeste asiático.

ESFEROCITOSIS

En la práctica diaria encontramos con cierta frecuencia cuadros citológicos de esferocitosis de grado variable. Si existe menos del 1% o del 2%, el fenómeno morfológico puede pasar inadvertido.

En el Cuadro N° 2 se indican una serie de causas de esferocitosis, en las cuales la morfología esferocítica es relevante en la mayoría de los pacientes allí señalados. Se enfatiza que las condiciones adquiridas son más frecuentes que las hereditarias.

Cuadro N° 2. Esferocitosis como morfología predominante	
Esferocitosis hereditaria	Patrón dominante (clásica). Patrón recesivo. Complicada (Hb S; tal, etc.).
Isoinmune neonatal (incompatibilidad ABO)	Con eritrocitos cubiertos por IgG o C3.

Cuadro N° 2. Esferocitosis como morfología predominante

Daño oxidativo agudo	Defectos en el “shunt” de las pentosas durante la crisis hemolítica: drogas oxidantes y químicos.
Reacción hemolítica transfusional	Usualmente asociada a Coombs +.
Eliptocitosis hereditaria severa con esferocitosis	
Septicemia hemolítica	<i>Clostridium welchii</i> .
Quemaduras severas	
Hipofosfatemia severa	Con hemólisis.
Esplenoheólisis	Esplenomegalia con hiperesplenismo.
Accidentes toxicológicos	Arácnidos, abejas, serpientes.
Rh nulo	

Dentro de los desórdenes adquiridos que cursan con esferocitosis importante, se encuentra la incompatibilidad ABO materno fetal y la anemia hemolítica autoinmune. También destaca la esferocitosis hereditaria, que se caracteriza por el hallazgo citológico en sangre periférica de la citopatología que origina su nombre, y cuyas características generales se detallan en el siguiente apartado.

ESFEROCITOSIS HEREDITARIA CLÁSICA

La esferocitosis hereditaria (EH) es una anemia hemolítica de origen genético, caracterizada por una evidente hemólisis acompañada de anemia, ictericia, esplenomegalia, cálculos biliares, reticulocitosis y la presencia de esferocitos en sangre periférica. Sin embargo, las manifestaciones clínicas son muy variables, dependiendo de si se trata de una anemia severa o moderada. Aunque todas las EH (sin importar el grado de anemia) poseen una característica común, que es la pérdida de área de superficie en la membrana (formación de esferocitos).

La herencia de esta membranopatía es usualmente autosómica dominante (tres cuartas partes de los casos), aunque también se han reportado casos recesivos. Las mutaciones espontáneas o de herencia recesiva deben sospecharse cuando no existe un historial familiar por EH. La incidencia estimada para esta membranopatía es de 1 en 2000 caucásicos; pero se presenta en todos los grupos étnicos y raciales.

La anormalidad fisiológica más importante en la EH clásica es una inestabilidad inherente de la membrana, ya que su citoesqueleto es estructuralmente anormal,

y evidencias indirectas sugieren que esto puede ser el resultado de uno o varios defectos de las proteínas que lo conforman. En la actualidad, se considera que el defecto más común es a nivel del gen de la ankirina (alrededor de un 50% de los casos), seguido por el gen de la β espectrina (20%) y el gen banda 3 (20%), y en la minoría de los casos, en el gen α espectrina o en gen proteína 4.2, cada uno con una frecuencia del 5%.

En la EH clásica, la expresividad del gen anormal varía desde formas mínimas o ligeras hasta problemas clínicos relevantes, y la mayoría de los pacientes presenta un síndrome hemolítico compensado.

Con una historia clínica cuidadosa, es posible demostrar que aproximadamente la mitad de los individuos con EH presentan ictericia neonatal. Esta puede cursar con importante hiperbilirrubinemia para demandar la exanguinotransfusión.

Al señalarse que alrededor del 25% de los casos de EH son esporádicos, se proponen la penetración incompleta del gen o, menos frecuentemente, la mutación espontánea, como mecanismos para explicar las diferencias que se observan, considerando que en ese porcentaje no existe historia familiar y que se trata de una enfermedad hereditaria mediada por un gen autosómico dominante.

Hay un ambiente adverso para el eritrocito en los cordones esplénicos, al ser este un medio congestivo, ácido e hipoglicémico, con una baja tensión de oxígeno, que hace que estas células se vean metabólicamente comprometidas y, como consecuencia, los procesos de fragmentación de la membrana y de formación de

esferocitos se aceleren. Esta fragmentación se da más fácilmente que en las células normales cuando se someten a estrés de manera directa o metabólica y, asimismo, hay una pérdida mayor de fragmentos de la membrana durante sus viajes circulatorios, al evidenciarse una disminución del 15-20% en su contenido de fosfolípidos y colesterol.

Por otra parte, existen distintas alteraciones moleculares a nivel de las proteínas del citoesqueleto y, como ya se mencionó, la deficiencia de espectrina es la más común. Estos defectos moleculares descritos en la EH se analizan en el Cuadro N° 3.

Cuadro N° 3. Defectos moleculares descritos en la esferocitosis hereditaria		
Defecto molecular	Cuadro hematológico	Herencia
Deficiencia de espectrina - Ligera o moderada - Severa	EH leve o típica. EH atípica severa.	Autosómica dominante. Autosómica recesiva.
Deficiencia combinada de ankirina y espectrina - Ligera o moderada - Severa	EH leve o típica. EH atípica severa.	Autosómica dominante. Incierta.
Deficiencia de proteína 4. 2	EH atípica. A. R.	Autosómica recesiva.
Defecto de la beta espectrina involucrando la interacción con la espectrina 4.1-actina	EH con acantocitos.	Autosómica dominante.

Hallazgos de laboratorio en la EH

La edad de la presentación se correlaciona en forma inversa con la severidad del cuadro de laboratorio; así, aquellos pacientes que presentan su cuadro en la infancia o en la niñez temprana, a menudo son moderadamente anémicos, mientras que los niños mayores y los adultos con frecuencia tienen una hemólisis compensada o, a lo sumo, una discreta anemia.

A cualquier edad, el cómputo de reticulocitos suele ser mayor a 8%; son más manifiestos los signos de hemólisis que el de hiperbilirrubinemia, el cual solo se presenta entre el 50% y el 60% de los pacientes. La sangre periférica clásicamente contiene muchos esferocitos. Sin embargo, en un alto porcentaje de los pacientes, los típicos esferocitos son casi infrecuentes, por lo que el frotis puede ser considerado normal, aun por investigadores experimentados. Es necesario recalcar la necesidad de estudiar la morfología roja en un área adecuada del frotis sanguíneo, a fin de evitar el reporte falso de esferocitos.

El reconocimiento de los esferocitos en un frotis es más difícil de lo que señalan los libros de texto. La proporción entre el diámetro y el grosor de los eritrocitos fijados

normales, tienen un promedio de 3,4. Cuando dicha razón es menor de 2,4, la esferocitosis es evidente, al presentar las células un aumento de su grosor con reducción de la biconcavidad central. De acuerdo con Bessis, las verdaderas células esféricas ocurren solamente en el estado prelítico, sin importar cuál sea su origen. Factores equinocíticos o estomatocíticos de suficiente fuerza, anticuerpos o hipertonicidad, todos llevan al mismo resultado. Como los esferocitos tienen volumen y contenido normal de Hb, al observarse al microscopio de luz parecen microcitos hiperocrómicos. El uso del término hiperocrómico es inadecuado, lo mismo que el hablar de microesferocito, dado su VCM normal y que por definición todos los esferocitos son pequeños.

La presencia de numerosas células equinocíticas o acantocíticas, así como de poiquilocitos, son inusuales antes de la esplenectomía y debería considerarse esto al momento de pensar en otro diagnóstico. Asimismo, los cuerpos de Howell Jolly y los eritroblastos también son infrecuentes antes de la esplenectomía y sugieren bloqueo reticuloendotelial. La médula ósea en la EH es de carácter hiperplásico normoeritroblástico y como el defecto de la EH solo se expresa en los reticulocitos circulantes, la eritropoyesis ineficaz no contribuye al fenómeno hemolítico en esta enfermedad. La

CHCM se halla incrementada al menos en un 50% de los pacientes, como resultado de una moderada deshidratación celular, siendo este un muy buen parámetro orientador al realizarse un hemograma manual.

De las pruebas más útiles para el diagnóstico de EH, la fragilidad osmótica (F.O.) es una de las más indicadas. Esta prueba intenta medir la capacidad que tienen los eritrocitos de la EH para soportar un incremento de su contenido acuoso. Como casi no hay intercambio de cationes durante el relativo corto tiempo de incubación de la prueba, el equilibrio osmótico se realiza por el rápido movimiento de agua a través de la membrana. Es bueno recordar que el eritrocito maduro tiene un diámetro de 7-8 μm , un volumen de 85-90 fl y un área de superficie de 140 μm^2 . Una esfera con un volumen de 90 fl tendría un diámetro aproximado de 5,5 μm y un área de superficie de 95 μm^2 . Los eritrocitos de la EH tienen prácticamente un área de superficie de membrana normal cuando salen de la médula ósea, pero conforme se pierde superficie de membrana, se van haciendo poco a poco más esféricos y menos flexibles. El cambio de la forma de discocito a esferocito hace a las células poco elásticas e infiltrables a través de los capilares esplénicos, que son los tamices más finos del organismo, por lo cual estas células tienen disminuida esa capacidad y hemolizan en presencia de soluciones escasamente hipotónicas; esto hace que la clásica curva de la F.O. se halle desplazada a la derecha y variando su forma según el porcentaje de esferocitos presentes al momento de realizarla. Con sangre fresca pueden observarse tres tipos de curva:

- **Tipo I.** Desplazada a la derecha, pero con una pequeña proporción de esferocitos.
- **Tipo II.** Desplazada a la derecha, pero con una pequeña prolongación casi horizontal o cola en las concentraciones de NaCl superiores de 0,60%. En los frotis es posible observar una heterogeneidad eritrocítica con presencia de esferocitos "prehemolíticos", que serían los que originan la morfología en caída de la curva terminal.
- **Tipo III.** Corresponde al tipo severo de F.O. aumentada, en la que la hemólisis es ya apreciable a concentraciones salinas cercanas a la fisiológica, como reflejo de una alta proporción de esferocitos en los frotis.

La sensibilidad de esta prueba puede aumentarse en forma considerable empleando sangre incubada a 37 °C por 24 horas. Esa modificación es útil sobre todo para la curva de tipo I y para las muestras que no revelaron una desviación anormal. Sin embargo, cerca

de un 25% de los pacientes tendrá una prueba normal con sangre fresca, en particular personas ligeramente afectadas, así como sus parientes, los cuales son más difíciles de diagnosticar. En contraste, la F.O. realizada 24 horas después de incubación provoca un estrés de los eritrocitos y, por lo tanto, un estímulo del defecto intrínseco.

La prueba de la autohemólisis, que no es más que una extensión de la prueba de F.O., es muy sensible y generalmente muy útil, a pesar de que los resultados son variables de laboratorio a laboratorio y en algunos casos se encuentran falsos positivos. Los glicósidos cardíacos aumentan la autohemólisis, en tanto que la sacarosa, el trifosfato de adenosina -ATP- (molécula osmóticamente activa) y la inosina la inhiben. Estas tres últimas sustancias ayudan a conformar un perfil de autohemólisis para el diagnóstico de EH, ya que, por ejemplo, es anormal en anemias hemolíticas autoinmunes que cursan con esferocitosis; esto a pesar de que el patrón es diferente de la típica EH, pues la autohemólisis no se corrige o se corrige mal con glucosa. Por otra parte, la autohemólisis en algunos pacientes con EH que presentan un gran número de esferocitos condicionados, no muestran una corrección de la prueba con glucosa, lo cual puede llevar a confusión.

Los otros métodos bioquímicos existentes, son las pruebas de lisis con glicerol, de las cuales la lisis ácida de Zanella y la prueba rosada de Vettore (Pink test), las más usadas y básicamente, lo que miden es la resistencia osmótica a soluciones de glicerol.

Por otra parte, la cuantificación de la espectrina por medio de RIA o ELISA permite detectar la deficiencia en los casos de EH leves; mientras que los métodos densitométricos permiten detectar deficiencias de más del 30% cuando se relaciona la espectrina con la banda 3.

Además de esos métodos indicados, se encuentran los estudios a nivel molecular, que buscan alteraciones en los genes que codifican para espectrina, ankirina y proteína 4.2.

A modo de resumen, el Cuadro N° 4 contiene las principales pruebas de laboratorio para el diagnóstico de esferocitosis, sea adquirido o hereditario.

Cuadro N° 4. Hemoglobinograma de la esferocitosis hereditaria
Hto/Hb= ↓/↓ CHCM = >35%
Morfología: anisocitosis, basofilia difusa y esferocitos; reticulocitos = 8% ($\bar{x}$) F. O. Fresco = 0,50% NaCl => 20% de hemólisis (NL =<6%) 0,55% => 10% (NL = 0%) F. O. Postincubación = 0,60% => 50% (NL = 0-40% de hemólisis) 0,65 => 30% (NL = 0-10%) 0,70 => 20% (NL = 0-5%)
Lisis glicerol = 25-142 seg.
Lisis glicerol (Vettore)= más de 25% de hemólisis Autohemólisis = sin glucosa= >15% (NL = >3%) con glucosa= (disminución en más del 50%)
Patrón electroforético Hb=AF (F=3-8%)
Análisis especiales: patrón electroforético de las proteínas de membrana (SDS. Page).
Cuantificación relación espectrina/banda 3 (densitometría).
Cuantificación espectrina por RIA o ELISA.
Detección de mutaciones por PCR.

Esferocitosis neonatal

Los bebés con EH suelen tener un valor de hemoglobina normal al nacer. La ictericia neonatal es común, por lo que requieren fototerapia y algunas veces exanguinotransfusión. Aproximadamente un 50% de los pacientes con EH manifiesta alguna sintomatología en el periodo neonatal. La anemia aparece alrededor de los 20 días de nacidos. En EH severas la esplenectomía es usual durante el primer año de vida.

Los criterios terapéuticos en estos casos son los mismos que los que se utilizan para la eritroblastosis fetal. La severidad de la ictericia o de la anemia no predice el curso clínico subsiguiente. En el periodo neonatal el diagnóstico puede complicarse, por cuanto en neonatos normales pueden observarse equinocitos y poiquilocitos, así como algunos esferocitos, lo que hace difícil el reconocimiento de la morfología típica de EH. Por otro lado, los reticulocitos se hallan disminuidos por la supresión postnatal de la médula ósea y pueden ser normales o ligeramente elevados en algunos infantes. La esplenomegalia es infrecuente y los niveles de haptoglobinas son normalmente mínimos en el periodo neonatal. En vista de que los glóbulos rojos fetales son osmóticamente más resistentes que los del

adulto, la utilidad de la F.O. en muestras no incubadas es baja, aunque la F.O. incubada sí constituye un arma diagnóstica adecuada.

La dificultad común para un diagnóstico diferencial en este período es entre EH e incompatibilidad ABO sintomática, que es unas 40 veces más frecuente que la EH y que tiene un cuadro clínico casi idéntico, con anemia, ictericia, esferocitosis y una F.O. incubada positiva. Los hechos que diferencian a las dos incluyen:

- Pacientes con EH clásica severa, con bloqueo esplénico por el gran número de células rojas muy defectuosas, que lleva a hipoesplenismo funcional, presencia de otras anomalías morfológicas de los eritrocitos y de cuerpos de Howell Jolly.
- Pacientes con anemia hemolítica autoinmune Coombs negativa.
- Pacientes con EH típica combinada con enfermedad neurológica o con trombocitopenia hipoplástica.

Diagnóstico diferencial

En términos generales, la EH es fácilmente diagnosticada y diferenciada de otras causas de esferocitosis. Sin embargo, hay varias situaciones en

las que el diagnóstico puede ser difícil; dentro de ellas, la EH versus incompatibilidad ABO en recién nacidos, la diferenciación entre EH y anemia hemolítica autoinmune Coombs negativa y el diagnóstico de EH severa luego de transfusiones. También se presentan dificultades diagnósticas en niños que son vistos por primera vez durante una crisis aplásica. La naturaleza de la crisis puede sugerir un proceso adquirido, y la ausencia de reticulocitos puede inicialmente llevar a no considerar que se trate de un proceso hemolítico.

En ocasiones, también puede hacerse difícil el reconocimiento de la EH si ocurren otras alteraciones hereditarias que logren enmascarar el fenómeno esferocítico, máxime si existe, en un paciente dado, el diagnóstico previo de algún trastorno eritrocítico más fácilmente demostrable. Algunos casos costarricenses que ejemplifican estas dificultades son, por ejemplo, un niño portador de HbS (AS) con un comportamiento clínico aberrante, pues sus niveles de Hb siempre oscilaban entre 8-10 g/dl. Un cuidadoso estudio de su hemoglobinoграмма logró demostrar que, además de su rasgo de HbS, presentaba alfa talasemia menor y esferocitosis. El otro fue un niño caucasoide de 7 años, con niveles de Hb entre 7 y 8 g/dl, el cual sufría de "anemia hipocrómica" que no respondía al tratamiento respectivo. Un abordaje analítico detallado logró demostrar la existencia de una EH en conjunción con una β -talasemia menor tipo HbA₂ alta. En ambos casos, la historia familiar fue positiva para EH.

En la literatura se encuentran varios reportes sobre estas situaciones polietiológicas, como EH y talasemia, drepanocitosis y EH, EH y deficiencia de G6PD. En analogía con lo señalado por investigadores, pareciera, pues, que es factible establecer el término de síndrome de esferocitosis hereditaria no solo para destacar el pleomorfismo clínico de la clásica EH de gene dominante, sino también lo relativo a EH homocigótica de gene recesivo y a aquellos cuadros que en forma hereditaria concurren a la presentación del cuadro clínico con otros trastornos del eritrocito.

La reaparición de la función medular después de una crisis aplásica (por infección con Parvovirus B19) puede causar problemas diagnósticos, toda vez que los reticulocitos de la EH tienen una morfología cercana a lo normal y parcialmente se enmascara la esferocitosis típica y las pruebas osmóticas de laboratorio. Además, la esferocitosis puede camuflarse si se asocia con desórdenes que incrementan la relación superficie/volumen, tales como deficiencia de hierro, ictericia obstructiva, síndromes talasémicos u otros trastornos hereditarios o adquiridos.

ELIPTOCITOSIS HEREDITARIA (ELH)

Este trastorno se considera más heterogéneo que la EH en su severidad y alteraciones morfológicas. Es un trastorno de herencia autosómica dominante; raros casos *de novo* han sido descritos. La incidencia de eliptocitosis en los Estados Unidos es no mayor a 1 por cada 4000 individuos, mientras que en África esta membranopatía aparece en el 1,6% de la población y al sureste de Asia puede llegar al 30% o más.

La disfunción de espectrina en la asociación dímero-dímero, así como la deficiencia de la banda 4.1 y de la glicoforina C, han sido algunos de los trastornos moleculares hallados en la ELH común.

La severidad clínica varía desde los cuadros asintomáticos con sobrevida eritrocítica normal, hasta los cuadros severos dependientes de transfusión.

La mayoría de pacientes son asintomáticos, con presencia de eliptocitos en sus frotis sanguíneos, además de otras alteraciones morfológicas eritrocitarias como esquizocitos, microcitos y dacriocitos. Los pacientes que presentan sintomatología durante el periodo neonatal, cursan con un cuadro hemolítico severo, a menudo transfusión dependiente, con alteraciones morfológicas que incluyen poiquilocitos y fragmentos eritrocíticos en el primer año. En el segundo año de vida el cuadro hemolítico se transforma en una forma leve de eliptocitosis. La hemólisis durante el periodo neonatal se atribuye a la presencia de la Hb F, la cual tiene una baja afinidad por la 2,3-DPG, lo que produce un incremento en la concentración intraeritrocítica de este metabolito, que desestabiliza la interacción del complejo banda 4.2 espectrina-actina, aumentando la inestabilidad de la membrana.

Generalmente, en los cuadros crónicos los pacientes requieren de esplenectomía. Las alteraciones morfológicas evidencian una severa poiquilocitosis con presencia de fragmentos celulares. En los casos homocigotos la diferenciación con la PPH es difícil, por la similitud que tienen entre sí.

Hay un cuadro denominado "eliptocitosis esferocítica", visto en caucásicos, en donde los pacientes cursan con moderada a leve hemólisis, esplenomegalia y glóbulos rojos con una morfología que va desde esferocitos hasta eliptocitos.

Diagnóstico de la ELH

El diagnóstico de la ELH, debido a su heterogeneidad clínica y a la notable ausencia de hemólisis en la

forma común, se basa principalmente en el hallazgo de eliptocitos en sangre periférica. En el frotis el porcentaje de eliptocitos y el radio axial de estos, son el fundamento para el diagnóstico. Se considera que los casos de ELH presentan en promedio un 60% de eliptocitos; sin embargo, hay casos que presentan entre el 15-20%, otros 90% y algunos pocos, valores cercanos a los de eliptocitos encontrados en sangre periférica de sujetos normales. En general, los eliptocitos no se ven al nacimiento, pero pueden hacerse evidentes al duodécimo día. Los reticulocitos en este trastorno son usualmente de forma normal. Es importante indicar que, a diferencia de los hallazgos de estas células en una anemia ferropriva o talasemia, los de esta membranopatía no presentan hipocromía.

En el caso de la ELH con hemólisis, el diagnóstico se sugiere por el cuadro bizarro de eliptocitos, poiquilocitos, dacriocitos y fragmentos celulares, así como basofilia difusa. En la ELH común, la prueba de fragilidad osmótica es normal, excepto en casos de hemólisis severa.

En cuanto a la prueba de estabilidad térmica de los eritrocitos, esta tiene importancia diagnóstica tanto en la ELH como en la piropoiquilocitosis hereditaria (PPH), ya que permite demostrar el defecto molecular de la espectrina. El análisis de la funcionalidad de la espectrina a través de su estudio electroforético en geles no desnaturizantes, permite detectar alteraciones en la relación dímero vs tetrámero en la membrana, con presencia abundante de dímeros, forma que normalmente no suele encontrarse en la membrana. El análisis de las proteínas de la membrana en geles de poliacrilamida tipo SDS-PAGE permite detectar defectos como la deficiencia de la banda 4.1.; mientras que la digestión parcial con tripsina de la espectrina, permite evidenciar mutaciones en la molécula, por medio de la aparición de péptidos anormales en la electroforesis en una dimensión o bien, en la electroforesis bidimensional. En ocasiones es imperativo el estudio familiar para poder descartar el carácter eliptocítico heterocigótico en los padres.

PIROPOIQUILOCITOSIS HEREDITARIA (PPH)

La piropoiquilocitosis hereditaria (PPH) es un desorden autosómico recesivo relativamente raro, descrito en caucásicos y población de descendencia Árabe. Hoy día se relaciona con la ELH, con una expresión clínica muy severa. Se habla de esa relación debido a que en muchos de los casos estudiados de PPH se encuentran defectos moleculares similares a los descritos para la ELH, siendo estos defectos en la asociación de los dímeros de espectrina, como producto de mutaciones en los puntos de contacto.

La PPH se caracteriza por una severa anemia hemolítica, semejante a la producida por quemaduras graves, característica que utilizó Zarkowsky y colaboradores, en 1975 y 1979, para dar el nombre al desorden. El cuadro periférico muestra la presencia de microesferocitos, fragmentos celulares y, en ocasiones, eliptocitos. El VCM y el HCM son marcadamente bajos. La prueba de fragilidad osmótica, al igual que la autohemólisis, se encuentra bastante alterada, en especial en el periodo post-incubación.

Los análisis de estabilidad térmica son similares a los encontrados en la ELH, y evidencian la inestabilidad de la espectrina. Los estudios de la estabilidad mecánica de la membrana en fantasmas y citoesqueleto se encuentran disminuidos. La membrana del glóbulo rojo muestra dos defectos, una deficiencia parcial de espectrina y un defecto en el ensamblaje de los dímeros de espectrina dentro de los tetrámeros.

ELIPTOCITOSIS ESTOMATOCÍTICA (OVALOCITOSIS DEL SUDESTE ASIÁTICO)

Esta membranopatía recibe otras denominaciones a parte de eliptocitosis estomatocítica, como lo es ovalocitosis del sudeste asiático, ovalocitosis hereditaria de melanesios y eliptocitosis de melanesia. Es de herencia autosómica dominante, cuyo defecto se da por una delección de nueve codones en el gen para la banda 3. Las personas heterocigotas para este defecto, son usualmente asintomáticas. Se sugiere que las formas homocigotas son incompatibles con la sobrevivencia del feto, ya que hasta la fecha no han sido reportados.

La principal característica morfológica es la presencia de una célula ovoide con alteraciones longitudinales de la membrana, que recuerda un puente, la cual recibe el nombre de estomatocito. Además, hay una reducida expresión de antígenos eritrocitarios, como el Rh D.

ESTOMATOCITOSIS HEREDITARIA

La estomatocitosis hereditaria es un desorden poco común, heredado en forma autosómica dominante. El cuadro hemolítico se caracteriza por una sobrehidratación de la célula, razón por la cual a esta membranopatía se le denomina también como hidrocitosis. La lesión involucra una ganancia de Na^+ , que provoca un aumento del contenido intraeritrocítico de agua y una disminución de la concentración de K^+ . La actividad de la $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPasa se encuentra 10 veces aumentada como mecanismo de compensación, el cual resulta insuficiente.

Los estudios de las proteínas de la membrana han reportado defecto a nivel de la banda 7.2 (estomatina), mientras que en otras ocasiones ha sido a nivel de la banda 4.2 (palidina) o de la banda 3 (proteína de intercambio aniónico).

La hemólisis es frecuentemente severa y los pacientes presentan ictericia de manera crónica.

En sangre periférica se observa un número variable de estomatocitos (10-30%); en algunos pacientes pueden observarse también codocitos. El VCM se encuentra aumentado, mientras que el CHCM está disminuido.

XEROCITOSIS HEREDITARIA

La xerocitosis hereditaria es una condición rara de anemia hemolítica de patrón autosómico dominante, caracterizado por una alteración de la permeabilidad de la membrana, provocando la deshidratación del eritrocito y la disminución de la fragilidad osmótica. El defecto condiciona una pérdida de K^+ , la cual es acompañada por una ligera ganancia de Na^+ que no compensa la pérdida de K^+ , por lo que consecuentemente hay pérdida de agua. El gen defectuoso no ha sido identificado aún.

En sangre periférica se encuentran xerocitos cuyo contenido de Hb se encuentra visualmente hacia uno de los bordes de la célula. También pueden observarse codocitos y un pequeño número de estomatocitos. El VCM es normal o bajo, mientras que el CHCM puede estar elevado.

ACANTOCITOSIS

Los acantocitos son eritrocitos maduros con proyecciones múltiples de irregular tamaño. Se encuentran en las siguientes condiciones:

a) *Abetalipoproteinemia*: esta es una enfermedad con herencia autosómica recesiva; por lo general, se presenta con diarrea y esteatorrea en los dos primeros años de vida. Hay síndrome neuromuscular importante y cambios degenerativos en la retina, que pueden llevar a ceguera (retinitis pigmentosa). Son prominentes las anomalías en los lípidos plasmáticos. Los triglicéridos están prácticamente en 0, el colesterol menos de 50 mg/dl y los fosfolípidos bajo los 100 mg/dl.

No se puede demostrar inmunológicamente la apoproteína β . El mecanismo de destrucción celular se debe, al parecer, a un incremento en la rigidez de la membrana, tal vez debido a un aumento relativo de la esfingomielina (un lípido rígido) sobre la lecitina (lípido fluido).

b) *Acantocitosis asociada con desórdenes neurológicos*: hay un gran número de anomalías neurológicas en las que se pueden observar acantocitos sin que existan alteraciones en las lipoproteínas ni retinitis pigmentosa. No se sabe la naturaleza de la anomalía en las neuronas y en el eritrocito. En algunas familias, parece haber un mecanismo autosómico dominante, en tanto que en otras parece ser autosómico recesivo.

c) *Acantocitos o células en espuela en enfermedad hepática*: este cuadro se ha descrito en hepatitis neonatal y en anemia hemolítica. Ocurre en pacientes con enfermedad hepatocelular severa, usualmente de tipo cirrosis alcohólica. La destrucción de estas células se produce en el bazo. El área de superficie de estos acantocitos se ve aumentada hasta un 70% con colesterol, mientras que el contenido de fosfolípidos es normal. En este sentido, las células en espuela son bien distintas de las frecuentes o usuales células en diana o codocitos que se observan en la enfermedad hepática, las cuales poseen un exceso de colesterol y de fosfolípidos.

Estos trastornos disminuyen la fluidez de los lípidos de la bicapa lipídica de la membrana, con la consiguiente disminución de la deformidad celular. Los eritrocitos normales adquieren la forma de espuela cuando se transfunden, lo que limita la utilidad de la terapia transfusional.

Aparentemente es la presencia de una lipoproteína anormal de baja densidad la que ocasiona el trastorno adquirido de esta patología del glóbulo rojo.

d) *Otras causas de acantocitosis*: anorexia nerviosa, niños con mala nutrición, mixedema, panhipopituitarismo y ausencia del antígeno Kell.

CODOCITOSIS

La presencia de codocitos en sangre periférica se observa en varias situaciones, como en desórdenes de síntesis de Hb (talasemia, deficiencia de hierro), mutación a nivel estructural de la Hb (Hb S, Hb C) o en desórdenes de hidratación celular (estomatocitosis hereditaria, xerocitosis hereditaria), entre otras.

Existe una situación hereditaria poco común, en la cual se visualiza un gran número de codocitos; esta es debida a una deficiencia de la enzima LCAT (lecitina colesterol aciltransferasa), producto de una mutación en el gen de la enzima, que conlleva a un aumento en la densidad de lipoproteínas dentro del eritrocito. El desorden es de herencia autosómica recesiva. Este cuadro cursa con hiperlipidemia,

proteinuria y aterosclerosis prematura. No se conoce el mecanismo exacto, pero se ha notado que luego de la esplenectomía, los glóbulos rojos pierden el exceso de lípidos, situación que gradualmente conlleva a la desaparición de los codocitos.

ERITROENZIMOPATÍAS

Introducción al metabolismo eritrocítico

Al ser el eritrocito una célula anucleada, ha perdido la capacidad que poseen los glóbulos rojos nucleados (eritroblastos) de sintetizar algunos compuestos vitales para la célula y producir energía por medio del ciclo de Krebs. Sin embargo, posee los sistemas metabólicos necesarios, producto de mecanismos genéticos bien establecidos, que facilitan la función de la Hb, el mantenimiento de la membrana, la energía y la protección antioxidativa. A pesar de haber perdido la vía de la fosforilación oxidativa o ciclo de Krebs, el eritrocito compensa dicha pérdida con la presencia de la vía glicolítica anaeróbica o vía de Embden-Meyerhof, suplementada con otras, como la vía de las pentosas fosforadas, el ciclo de glutatión, el desvío de Rapaport-Luebering (2,3 DPG) y el ciclo de los nucleótidos.

La energía obtenida a partir de la glicólisis le permite a esta célula realizar sus funciones y sobrevivir. Cabe destacar que además de la glucosa, pueden utilizarse otras fuentes energéticas, como la adenosina, la inosina, la manosa, entre otras, las cuales también ingresan pasivamente al eritrocito; dichas fuentes le permiten al eritrocito mantener:

- a) El hierro del grupo heme en estado reducido (Fe^{+2}).
- b) El gradiente de sodio y potasio intracelular mediante la bomba de Na^+/K^+ .
- c) La reducción de los grupos sulfhidrilos tanto de las enzimas, de la hemoglobina, como de las proteínas de la membrana.
- d) La forma bicóncava del eritrocito.
- e) El autoabastecimiento de los ciclos que contribuyen a lograr los puntos anteriores.

VÍA DE EMBDEN-MEYERHOF (GLICÓLISIS), CICLO DE 2,3 DPG, VÍA DE LAS PENTOSAS FOSFORADAS Y CICLO DEL GLUTATIÓN

La glicólisis es la vía anaerobia por donde la glucosa, fuente primaria de energía, es catabolizada aproximadamente en un 95% a ácido pirúvico. La primera parte de la glicólisis ocurre cuando las hexosas entran al ciclo, se fosforilan por medio del ATP y forman el gliceraldehído 3 fosfato; la segunda fase es una ruta común para todos los azúcares y en ella tienen efecto las etapas de óxido-reducción y los

mecanismos de conservación de energía en forma de ATP. En resumen, en esta vía se produce ganancia de ATP y de NADH.

La glicólisis le permite al glóbulo rojo: mantener el ambiente catiónico interno adecuado por medio de la bomba Na^+/K^+ , favorecer la flexibilidad de la membrana mediante la fosforilación de proteínas y reducir la metahemoglobina (Fe^{+2}) por medio de la NADH metahemoglobina reductasa.

A partir de la glicólisis, también conocida como ruta de Embden-Meyerhof, se derivan tres caminos metabólicos adicionales ligados a esta: la vía de las pentosas fosforadas (*shunt* de las pentosas), el ciclo de 2,3 DPG (desvío de Rapaport-Luebering), ligado a la primera, y el ciclo del glutatión.

Una vez que la glucosa ingresa a Embden-Meyerhof, en el segundo paso de esta, puede continuar por dicha vía para llegar finalmente a formar piruvato (proceso mediado por la enzima piruvato quinasa), con la consecuente ganancia de ATP, o a partir de la glucosa 6 fosfato desviarse a la ruta de las pentosas fosforadas y así, contribuir al catabolismo detoxificante.

Siguiendo con la glicólisis, otro punto esencial es la síntesis de 1,3 difosfoglicerato (1,3 DPG), donde a partir de esta molécula hay un desvío metabólico para producir el 2,3 DPG, compuesto muy importante en el funcionamiento de la hemoglobina (Ciclo Rapaport-Luebering). El 2,3 DPG provoca cambios en la curva de disociación de la hemoglobina y el oxígeno, generando una liberación más fácil de oxígeno al unirse el 2,3 DPG con la desoxihemoglobina, y favoreciendo la oxigenación tisular. Además, el 2,3 DPG altera la unión del CO_2 y de los iones hidrógeno (efecto Bohr); también se han logrado determinar efectos no relacionados directamente con la hemoglobina, como los de tipo inhibitorio sobre las enzimas glicolíticas y algunas del ciclo de las pentosas fosforadas y del metabolismo de los nucleótidos.

La otra vía metabólica que se deriva del ciclo de Embden-Meyerhof es la denominada vía de las pentosas fosforadas. Esta es muy importante porque es regulada en parte por la enzima glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PD), y tiene relación directa con la protección del eritrocito al daño oxidativo. Por medio de la G6PD se genera al final el poder reductor contra agentes oxidantes, como el peróxido de hidrógeno y el anión superóxido. Como se estudiará más adelante, existe una deficiencia hereditaria de dicha enzima que se asocia con hemólisis oxidativa. La función de esta vía es mantener el glutatión en forma reducida. El glutatión es un compuesto que

actúa como sustancia detoxificante, que protege a la célula contra agentes oxidativos externos e internos en unión de otras enzimas antioxidantes. Para lograr este propósito, el ciclo genera la forma reducida de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), como producto de la acción de la enzima G6PD. Esta vía es la principal fuente de NADPH en los glóbulos rojos, pues se producen dos moles de NADPH por cada mol de glucosa metabolizada. El NADPH sintetizado, en asociación con la enzima reductasa del glutatión, mantiene al glutatión en forma reducida, para que en conjunto con la peroxidasa del glutatión, la superóxido dismutasa y la catalasa, inactiven los agentes oxidativos.

En los eritroblastos, una función adicional de esta última vía es la de sintetizar la ribosa 5 fosfato, que actúa cuando se utilizan acarreadores de electrones artificiales, como el azul de metileno, para la reducción de la metahemoglobina (Fe^{+3}) (Hi); este es un sistema básicamente de emergencia y es el que se ha tomado de base para el tratamiento de los problemas en los cuales existen aumentos de la concentración de la metahemoglobina

En la Figura N° 2 se muestra la interrelación entre todos los procesos metabólicos, simplificando la glicólisis en los pasos esenciales.

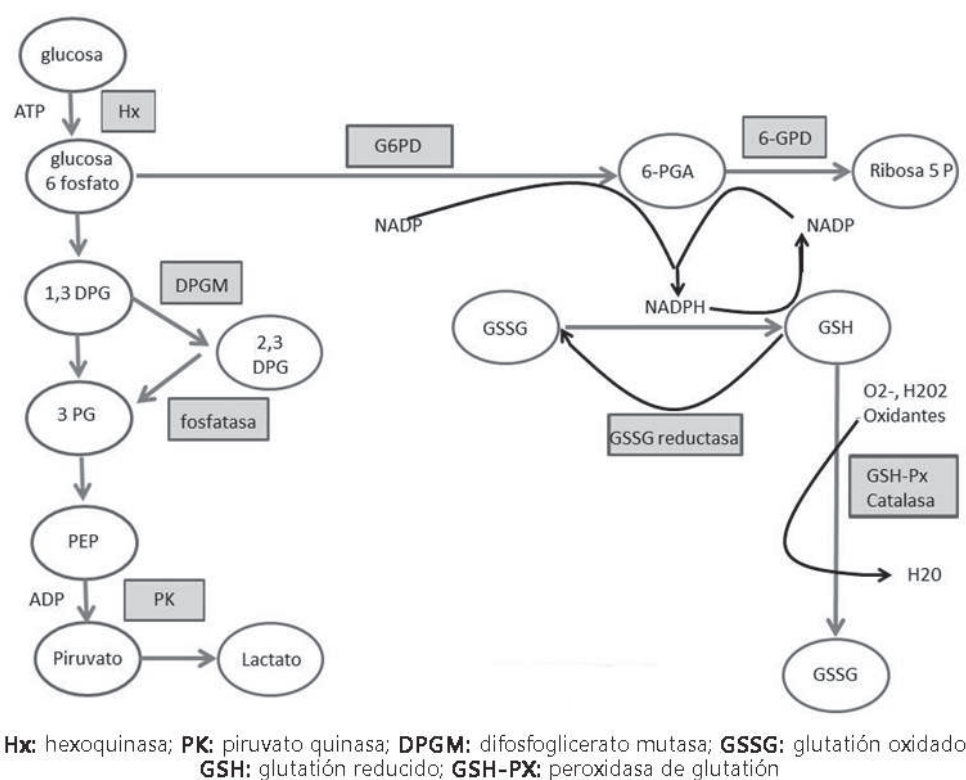


Figura N° 2. Vías metabólicas del eritrocito.

DEFICIENCIA HEREDITARIA DE G6PD

La deficiencia de la G6PD es el defecto enzimático más común a nivel mundial. Se estima que cerca de 400 millones de personas se encuentran afectadas en todo el mundo. Se han identificado unas 400 variantes de la enzima con base en determinaciones bioquímicas. La mayoría de esas mutantes se asocian con desórdenes clínicos; otras con anemia hemolítica crónica; otras con cuadros episódicos o ambos.

La historia moderna del estudio de este defecto hereditario comienza en el año 1926, cuando Cordes

reporta unos casos de hemólisis aguda por exposición a una aminoquinolina. Pasaron varias décadas, hasta que en la Guerra de Corea un porcentaje de soldados afroamericanos desarrollaron anemia hemolítica episódica posterior al tratamiento con primaquina. A mediados de la década de 1950 se identificó la G6PD como la responsable de este fenómeno hemolítico y posteriormente, se describió el defecto como ligado al cromosoma X.

La G6PD es una enzima que posee dos formas normales. La enzima normal se denomina G6PD (B^+) o GdB. La variante denominada GdA⁺, tiene actividad

normal y se distingue de la forma B por poseer una movilidad electroforética mayor. La GdA⁺ ocurre en un 20% de los individuos de raza negra americana. Posee propiedades catalíticas normales y por lo tanto, no hay problema de hemólisis. Su estructura difiere de la normal (GdB) por la sustitución de asparagina por aspartato en la secuencia de una mutación en el nucleótido (nt) 376 (AG), que es la que le confiere el aumento en su movilidad electroforética.

Se han descrito muchas formas anormales de la enzima. De estas, las más importantes son las variantes de las formas A⁺ y B⁺ llamadas G6PD (A⁻), GdA⁻ o variante africana, y G6PD (B⁻) o Gd mediterránea. La primera presenta adicionalmente a la mutación en nt 376 una en el nucleótido 563.

La GdA⁻ es la variante más común asociada con hemólisis episódica y se encuentra de forma predominante en raza negra. Su movilidad electroforética es idéntica a la de GdA⁺, pero su actividad catalítica se halla disminuida. La enzima anormal GdA⁻ posiblemente se sintetiza en cantidades normales, pero tiene disminuida su estabilidad *in vivo*. La GdB⁻ o Gd mediterránea es la segunda variante más común y se encuentra en los pueblos del área mediterránea (Cerdeña, judíos sefarditas, árabes, etc.). Su movilidad electroforética es idéntica a la de la enzima normal GdB, pero su actividad catalítica es marcadamente disminuida. La GdB⁻ parece resultar de la formación de moléculas con una actividad enzimática disminuida. La deficiencia de G6PD también se ve en poblaciones orientales, en donde la variante más común es la Gd-Canton, una mutante con propiedades similares a la Gd mediterránea.

Epidemiología

El origen de la deficiencia de la G6PD se ha asociado a su efecto protector contra *Plasmodium falciparum*. Al respecto, se han desarrollado muchos estudios, incluyendo la coincidencia geográfica de zonas de alta incidencia de malaria, con alta prevalencia de la deficiencia de la enzima. Otras investigaciones han comprobado diferentes mecanismos protectores del eritrocito deficiente ante la infección por el parásito. Entre ellas se ha indicado el daño oxidativo al parásito, reducción en la multiplicación de este y mejor fagocitosis de eritrocitos parasitados. La distribución geográfica de la deficiencia de G6PD ha servido de soporte a la hipótesis de que los pueblos con este defecto enzimático son más resistentes a la malaria. Los parásitos de la malaria requieren GSH y un mecanismo oxidativo óptimo derivado del metabolismo de la glucosa. Por tanto, el bajo contenido de GSH y la actividad disminuida del ciclo oxidativo directo de los

eritrocitos primaquina sensibles, son los factores que aparentemente dificultan la vida intracelular de estos parásitos

La variante GdA⁻ abarca cerca del 90% de los casos africanos; además, se encuentra en el Caribe, Suramérica y Norteamérica, así como en regiones de España, Portugal y el Medio Este. La GdB⁻, como se mencionó, se detecta en los países de la región del Mediterráneo, el Medio Este y las regiones de la India.

Estructura molecular de la G6PD

La G6PD posee una estructura activa en forma de dímero y de tetrámero, según las condiciones del medio en que se encuentre. Los monómeros son catalíticamente inactivos y tienen un peso de 53 kDa. Se ha postulado que el NADP está relacionado con la actividad, tanto así que el tetrámero posee cuatro moléculas de este compuesto y la forma dimérica dos. La importancia del NADP en la estructura se ha comprobado, además, porque en pacientes con anemia hemolítica crónica severa las mutaciones en la proteína están en la región donde se une el NADP estructural.

Función de G6PD en el metabolismo

Como ya se citó, a partir de la glicólisis se deriva la vía de las pentosas fosforadas. Entre el 5% y el 15% de la glucosa es catabolizada por el eritrocito, a través de la vía metabólica de las pentosas fosforadas (VPF), que produce NADPH, el cual se asocia con la producción de glutatión reducido, que es el principal agente protector contra daño oxidativo del glóbulo rojo. Su actividad se ve amplificada por la participación de enzimas como la superóxido dismutasa, catalasa y peroxidasa. La G6PD es la enzima clave en la regulación de esta vía, por lo cual su deficiencia hereditaria va a predisponer al eritrocito a hemólisis oxidativa, ya sea aguda o crónica.

Hemólisis oxidativa

La deficiencia de la G6PD va a cursar con dos cuadros diferentes de hemólisis. El primero, que es el más frecuente, es la hemólisis episódica o aguda. Esta se produce cuando hay un exceso de agentes oxidantes externos, por lo general medicamentosos, por estrés oxidativo o por alimentos. Aquí se incluye la administración de fármacos o drogas, las infecciones y el favismo, que es una anemia hemolítica aguda, posterior a la ingesta de un frijol llamado *Vicia fava*. Este es un cuadro normalmente limitado, que se recupera al eliminar el estímulo oxidativo externo.

El otro proceso por daño oxidativo es el denominado anemia hemolítica crónica no esferocítica (AHCNE), y se caracteriza por la destrucción de eritrocitos que ocurre con la producción normal de agentes oxidativos del organismo, sin que medie ingesta externa. Es un proceso más severo y a la vez, menos frecuente.

Mecanismo de hemólisis

Como se mencionó, la destrucción eritroide en sujetos deficientes de la enzima cursa con dos cuadros distintos; por un lado la hemólisis episódica y por otro, la hemólisis crónica no esferocítica (AHCNE). La primera es por exposición directa a agentes oxidativos

externos, usualmente autolimitada, y la segunda, más severa, producto del daño por agentes oxidativos que suelen producirse *in vivo*.

En el caso de la anemia hemolítica aguda o episódica, el mecanismo fisiopatológico involucra la formación de cuerpos de inclusión (Heinz), producto del daño oxidativo que resulta del consumo de GSH por la exposición a agentes externos. El proceso conlleva la formación de metaHb y sulfoHb. En el caso de la AHCNE, la hemólisis se desarrolla con los productos oxidativos que se sintetizan en el organismo (Figura N° 3).

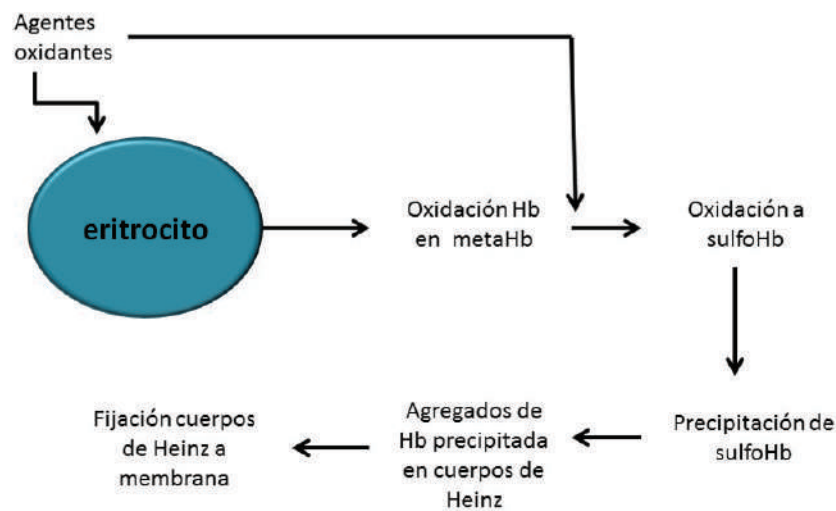


Figura N° 3. Mecanismo general de hemólisis en la deficiencia de la G6PD.

Los cuerpos de Heinz afectan la membrana celular; disminuyen la deformabilidad e incrementan su permeabilidad a cationes y su fragilidad osmótica. Estos cuerpos de inclusión son eliminados de los glóbulos rojos circulantes por acción de los macrófagos del bazo, mediante un proceso de picoteo (hemólisis extravascular). Por tal motivo, dichos cuerpos son más numerosos en pacientes esplenectomizados y no se observan con las tinciones convencionales; para poder visualizarlos deben emplearse técnicas supravitales como las de azul cresil o la del violeta de metilo. En los frotis de sangre teñidos con Wright no es infrecuente ver glóbulos rojos con bocas marginales o células triangulares, como resultado presumible de la remoción de cuerpos de Heinz en pacientes con hemólisis inducida por oxidantes. Otro hallazgo morfológico lo constituye la presencia de esferocitos producto del picoteo de la membrana. Es importante señalar que al comprometerse la integridad de la membrana, además de la hemólisis extravascular, también hay destrucción

intravascular.

A lo largo de la historia se han descrito muchos agentes externos causantes de hemólisis aguda. Entre ellos es bien conocido el frijol *Vicia fava* (que produce el cuadro agudo de favismo), el daño oxidativo por infecciones y, finalmente, la exposición a medicamentos o agentes químicos que desarrollan hemólisis oxidativa. Entre los fármacos, hay algunos como los antimaláricos que son bien conocidos por su efecto tóxico y la destrucción episódica en sujetos deficientes. En muchos casos, un metabolito, más que la droga como tal, aparece como agente hemolítico. Las drogas son metabolizadas principalmente en el hígado, donde pueden dar lugar a la formación de un intermediario hemolítico o son detoxificadas. Por lo tanto, hay oportunidad para la interacción del sistema hepático metabolizante de la droga con la deficiencia eritrocítica de G6PD, en el sentido que se produzca o no una respuesta hemolítica. Un buen ejemplo de lo

anterior lo ofrece la tiozosulfona, una de las sulfonas que causa hemólisis en aproximadamente la mitad de los pacientes deficientes en G6PD con el fenotipo

GdA-. En el cuadro N° 5 se mencionan estos y otros medicamentos asociados a hemólisis episódica.

Cuadro N° 5. Fármacos y agentes químicos que inducen hemólisis en glóbulos rojos deficientes en la enzima G6PD	
Analgésicos: Acetanilida Ácido acetilsalicílico Fenazona Aminofenazona Fenacetina Antipirina Aminopiridina (Pyramidon)	Misceláneos: Naftaleno Vitamina K (análoga soluble en agua) Probenecid (Benemid) Trinitrotolueno Azul de metileno Dimeraprol (BAL) Fenihidrazina Quinina Quinidina Frijoles de fava Ácido nalidíxico (Wintomilon)
Sulfonamidas y sulfonas: Sulfanilamida Sulfapiridina N2-Acetilsulfanilamida Sulfaetamida Sulfafurozole Tiazosulfona (promizole) Salicilazosulfapiridina (azulfadine) Aldesulfona sódica Sulfametoxipiridazina (kynex) Sulfoxone (dapsone) Diaminofenilsufona (DDS) 2-amino-5-Sulfanitiazole Sulfisoxazol (gantrisin)	Agentes antibacterianos no sulfamídicos: Furoxolidona (furoxone) Nitrafurantoina (furadantin) Cloranfenicol Ácido para aminosalicílico Furaladona (altafur) Nitrofurazona (furadin)
	Antimaláricos: Primaquina Pamaquina Pentaquina Mecacrina Quinocida Quimacrina (Atabrina)

Relación de la enzima y la hemólisis

En las células rojas normales, *in vivo*, la actividad intracelular de la GdB normal decae lentamente con una $t_{1/2}$ de 60 días. A despecho de esta pérdida de actividad enzimática, las células retienen suficiente actividad de Gd como para producir NADPH y mantener al glutatión como GSH ante un estrés oxidante. El defecto en la GdA- da como resultado una variante con una estabilidad enzimática anormal y una $t_{1/2}$ de 13 días. Por lo tanto, las células jóvenes presentan una actividad normal, mientras que las viejas se encuentran muy deficientes y por ende, anormalmente sensibles a agentes oxidantes. Por lo general, estas variantes son las que producen la hemólisis episódica que es menos severa. La Gd mediterránea (B-) es aún más inestable y la actividad en eritrocitos jóvenes es baja; no hay virtualmente actividad en las células maduras, produciendo AHCNE. Se ha estimado que la $t_{1/2}$ de la

GdB (normal) es de 60 días; 13 días la de la GdA-; 8,5 días la de la GdB-; y menor de 8,5 días la de la mayoría de las variantes que cursan con AHCNE. En tanto que la hemólisis inducida por medicamentos es clásicamente intravascular, la hemólisis crónica que se presenta en enfermos con AHCNE es sobre todo extravascular, como lo prueban la ausencia de hemoglobinuria crónica y una deficiencia de hierro superpuesta.

Genética de la G6PD

El gen que codifica para esta enzima se encuentra en el cromosoma Xq28. El mecanismo de herencia está ligado al sexo. Alrededor de un 13% de hombres de origen afrocaribeño son deficientes de G6PD (hemicigotos). En ese grupo étnico más o menos el 25% de las mujeres son heterocigotas y aproximadamente, el 1-3% de ellas resultan ser homocigotas. En las heterocigotas, en vista del fenómeno de Lyon, existen

dos poblaciones de eritrocitos: una que posee una actividad enzimática absolutamente normal y otra que es deficiente, tal y como la de los hemocigotos. En promedio, una de cada cuatro mujeres heterocigotas presentará predominio de la población deficiente y, por lo tanto, serán susceptibles de fenómeno hemolítico semejante al que se observa en las homocigotas o en el hemocigoto. Las mujeres pueden ser, además, heterocigotas u homocigotas para determinada variante de la enzima. La actividad enzimática en mujeres que poseen un gen de G6PD deficiente puede ser normal moderadamente reducida (usual) o marcadamente deficiente en G6PD. Sin embargo, la magnitud absoluta de la hemólisis suele ser menor, en vista de que es menor la población celular vulnerable.

En un estudio de la distribución polimórfica de la

G6PD en Costa Rica (Cuadro N° 6) se muestran las características de la población costarricense, la cual no difiere de otras a las que se les atribuye el mismo origen étnico. Investigaciones a nivel genético en grupos de raza negra, han confirmado en Costa Rica la variante GdA⁻, y se han caracterizado a nivel molecular las variantes Gd Puerto Limón y Gd Santamaría; la primera posee una mutación en el nt 1192, sitio íntimamente relacionado con el de unión del NADP en la molécula, hallazgo característico en las variantes que se asocian a AHCNE, tal vez por la importancia de este nucleótido de adenina en la estabilidad de la molécula de G6PD. En la Gd Santamaría la mutación detectada es en nt 542 (A-T). Los análisis del ADN en este momento tienen el fin de establecer si las mutaciones en las variantes hasta hoy descritas corresponden a una nueva variante o a una misma ya descrita.

Cuadro N° 6. Polimorfismo de la G6PD en hombres en Costa Rica		
	Raza negra	Caucásica
GdA (+)	15,0	0,45
GdA (-)	10,7	-
GdB (+)	72,4	99,1
GdB (-)	1,2	0,45
Raras	0,7	-

Fuente: Chaves M, Sáenz G, Quintana E, Montero A, Jiménez J. Polimorfismo de la G-6-PD eritrocítica en Costa Rica. Sangre 1988; 33 (1): 12-14.

Aspectos clínicos

Como ya se citó, hay cinco tipos de cuadros clínicos ligados a la deficiencia de esta enzima:

- Ictericia neonatal:** las variantes mediterráneas y A⁻ se asocian a este cuadro, que puede producir kernicterus. En países del Mediterráneo es una importante causa de hemólisis neonatal.
- Favismo:** se produce por exposición al frijol *Vicia fava* en cualquier estado. Se ha determinado que la divicina, presente en este tipo de leguminosa, desencadena el daño oxidativo. Las variantes mediterráneas, la Canton e incluso la A⁻ se asocian a este cuadro.
- Hemólisis por infección:** se ha determinado la acción de radicales libres en procesos infecciosos (tifoidea y hepatitis viral).
- Hemólisis aguda inducida por drogas:** causada principalmente por la variante A⁻ (en el Cuadro N° 5 se indicaron los agentes farmacológicos asociados).

- AHCNE:** es un cuadro de hemólisis crónica, inducido por los niveles normales de agentes oxidativos en el organismo. Aunque el proceso es usualmente extravascular, puede tener también un componente intravascular.

Por lo general, la hemólisis en caucásicos (GdB⁻) es más severa, ya que existe una marcada deficiencia de la enzima en todos los eritrocitos. En estos sujetos caucásicos, la persistencia de una infección o la administración continuada de una droga oxidante puede producir una anemia significativa, en ocasiones fatal. La muerte debida a deficiencia de G6PD es rara, pero cuando esta ocurre es en el grupo de pacientes de raza blanca. Las mujeres caucásicas pueden presentar episodios hemolíticos significativos; la magnitud de la hemólisis es proporcional al grado de lyonización. La anemia hemolítica crónica no esferocítica (AHCNE) debida a variantes severas de G6PD se ve solamente en individuos de raza blanca y en orientales. En algunas personas con AHCNE la esplenectomía ha sido beneficiosa. En determinados individuos la mutante GdB⁻ puede originar AHCNE.

Fase hemolítica aguda

A pesar de que esta fase se presenta desde que se inicia la administración de la droga, los niveles de Hto y Hb comienzan a declinar hasta el segundo o tercer día. Los cuerpos de Heinz se hacen presentes espontáneamente en la sangre periférica durante los primeros días de la administración de la droga, pero desaparecen cuando se establece la hemólisis. Durante estos primeros días la caída del GSH es rápida, lo que precede al fenómeno hemolítico. En los días subsecuentes la hemólisis es evidente y los hallazgos hematológicos en este tiempo son aquellos característicos de una anemia hemolítica aguda, con valores elevados de bilirrubina, hemoglobinemia y hemoglobinuria. Se ha estimado que entre el 30-50% de la masa eritrocítica es destruida, pero se limita a los glóbulos rojos viejos.

Fase de recuperación

Se inicia cuando se observa la máxima declinación de los niveles Hb, a pesar de que no se suspenda la dosis de medicamento. Los máximos niveles de reticulocitos se observan en esta fase, con valores de 8% al 12%, y los valores de Hto y Hb llegan en forma lenta a los niveles basales, mediante glóbulos rojos jóvenes y relativamente jóvenes (de menos de 50 días). La recuperación clínica toma entre 30 y 40 días.

Fase de resistencia o equilibrio

Comienza cuando la anemia desaparece, pero persiste mientras se mantenga la misma dosis del medicamento. Una hemólisis ligera continúa, pero es limitada a aquellas células rojas que tienen una edad suficiente como para hacerse sensitivas al agente oxidante. Niveles normales de Hto se mantienen en tanto no sea excedida la capacidad regeneradora de la médula ósea; todo ello da un cuadro de síndrome hemolítico crónico compensado, el cual persistirá en tanto se siga administrando el agente oxidante.

Hay factores que pueden además exacerbar el cuadro

hemolítico; entre ellos se destaca el tipo de droga o medicamento, la concentración sanguínea de este o la de un producto de su metabolismo. La enfermedad hepática o renal ocuriente, la acidosis diabética y bajos niveles de glicemia, refuerzan la actividad oxidante de los medicamentos oxidantes. La causa que provoca la hemólisis en la deficiencia de G6PD es principalmente ambiental.

Algunos estudios recalcan la importancia de detectar, en zonas de alta incidencia, a aquellos donadores con la deficiencia, ya que pueden tener poca vida media, especialmente en receptores sometidos a terapias farmacológicas con agentes oxidativos.

Hallazgos en Costa Rica

En 1966 Alvarado trabajó en una tesis de grado sobre actividad de G6PD en recién nacidos normales e ictericos de la provincia de San José. Aunque no encontró ningún caso positivo de ictericia neonatal por deficiencia de G6PD, durante su trabajo logró detectar dos deficiencias en adultos que sufrían crisis hemolíticas por este defecto.

En 1972 se encontró en la población de raza negra de Limón una frecuencia de 14,5% en varones y de 3,3% en mujeres homocigotas. Al año siguiente se obtuvo un 4,3% de varones deficientes en población mestiza de Santa Cruz, Guanacaste, y de 0,2% en caucásicos de San José. Además, en un estudio de 12.000 escolares se logró demostrar un 2,3% de varones deficientes, al margen de su condición racial.

En 1974, Castro y Snyder reportaron una nueva variante de G6PD en un varón caucásico costarricense, que era indistinguible de la GdA⁻ por electroforesis, pero diferente por estudios de inhibición con NADPH. A la mutante se le denominó Gd San José.

En 1988, Chaves y colaboradores lograron establecer la distribución de cada una de las variantes, mediante estudios electroforéticos, tal como se muestra en el Cuadro N° 7.

Cuadro N° 7. Fenotipos de G6PD en varones de Costa Rica				
Raza negra	A(+)	A(-)	B(+)	Raras o lentas
N=253	38	27	183	2
%	15	10,7	72,4	0,7
Raza caucásica	A(+)	B(+)	B(-)	
N=222	1	220	1	
%	0,45	99,1	0,45	

Por otra parte, se encontró en este país una variante de migración semejante a la GdB, cuyo comportamiento físico-químico y posteriormente molecular a nivel de ADN, ha hecho que se le caracterice como mutante nueva, de gran expresividad clínica, que origina en el paciente una forma de AHCNE. Se le ha designado como Gd Puerto Limón.

En 1984 se reportó la variante Gd Santamaría, la cual presenta expresividad clínica cuando se expone a agentes oxidantes, produciendo cuadros de hemólisis esporádica, al menos en uno de los dos propositus analizados. En estudios posteriores, en la ciudad de Santa Cruz de Guanacaste, la frecuencia de la deficiencia fue del 3,7%, en tanto que en una población de recién nacidos de raza negra de la provincia de Limón fue del 5,6%.

Tiempo después, un estudio realizado en recién nacidos con ictericia neonatal, sin antecedentes de incompatibilidad materno fetal, mostró un 3,4% de deficiencia de G6PD. Otro estudio, que dejó importantes inquietudes, fue el realizado a un grupo de donadores voluntarios de sangre, en el cual se encontró un 0,4% de deficientes en la enzima. A pesar de lo bajo de la frecuencia, no deja de ser un problema, por lo que a nuestro criterio deben establecerse métodos rápidos de diagnóstico para evitar una dificultad posterior.

En 1986, Sáenz y colaboradores intentaron demostrar una correlación entre la presencia de Hb S y la deficiencia de G6PD, a fin de determinar la coexistencia de dos factores selectivos que protegen contra la malaria y de alta frecuencia en la raza negra; sin embargo, al igual que en otros estudios, los resultados no lograron comprobar este hecho,

Cinco años después, Sáenz y Rodríguez, en asocio con Beutler, realizaron la caracterización molecular de la variante africana en Costa Rica, así como de las variantes costarricenses G6PD Puerto Limón y Santamaría.

DEFICIENCIA DE PIRUVATO QUINASA (PK)

Esta deficiencia es la segunda eritroenzimopatía más importante, y la principal causante de AHCNE. Se ha estimado una prevalencia de 51 casos por millón de habitantes en poblaciones predominantemente caucásicas.

La piruvato quinasa (PK) es la enzima que cataliza la conversión del fosfoenolpiruvato (FEP) a piruvato, con síntesis de ATP. Este es utilizado en aquellos procesos eritrocíticos que requieren energía (bomba $\text{Na}^+ - \text{K}^+$, automantenimiento de la vía, estructura y flexibilidad de la membrana, entre otros).

Genética de la PK

La PK se hereda con un patrón autosómico recesivo. Se han descrito distintas mutaciones, de las cuales la 1529A es frecuentemente encontrada en Europa y Estados Unidos, mientras que en grupos asiáticos se detecta con más frecuencia la mutación 1456T. Los pacientes afectados son normalmente dobles heterocigotos para variantes distintas de la enzima.

Existen cuatro isoformas distintas de la enzima, codificadas en dos genes distintos (PKM y PKR). Estas isoformas son M1, M2, L y R. La enzima funcional es un tetrámero.

Aspectos clínicos y fisiopatológicos

El cuadro clínico del paciente con deficiencia de piruvato quinasa es el de una anemia hemolítica crónica no esferocítica (AHCNE), que varía en cuanto a su severidad, presentación y respuesta al tratamiento (esplenectomía) y, generalmente, los síntomas dependen de la gravedad de la anemia que presente el paciente, como sucede con otras enzimopatías.

Este cuadro está limitado por las características de la hemólisis crónica y por las complicaciones relacionadas. Dichas manifestaciones pueden ir desde una severa anemia neonatal, transfusión dependiente, hasta una anemia hemolítica totalmente compensada, con un individuo de apariencia normal.

El mecanismo de hemólisis no está bien comprendido del todo. El defecto en la síntesis de ATP se asocia al proceso de destrucción, pero aparentemente no es el único mecanismo relacionado. Es frecuente con la PK la falta de congruencia entre su actividad *in vitro* y un cuadro clínico particular. Hay un aumento del 2,3 DPG que tiene un efecto benéfico, ya que condiciona una disminución de la afinidad de la Hb por el oxígeno, disminuyendo los efectos de la hipoxia producto de la baja concentración de la hemoglobina. Sin embargo, algunos estudios indican que estos altos niveles de 2,3 DPG también poseen efectos negativos, como la reducción de la glicólisis al inhibir la hexoquinasa, la G6PD y el fosforribosilpírofosfato, incrementándole el estrés al eritrocito.

La anemia es crónica y muchas veces se diagnóstica al irse descartando otras problemáticas. Los pacientes se diagnostican normalmente en edades tempranas de la vida, al presentar signos de anemia hemolítica variable entre cuadros compensados y anemias severas que requieren transfusión. Agentes externos, como infecciones, pueden acelerar el cuadro clínico. Debido a la mencionada disminución de la afinidad de la hemoglobina por el O_2 , los síntomas producidos por

la anemia suelen ser más severos en la infancia y van disminuyendo con el crecimiento.

La ictericia suele depender de la tasa de hemólisis y de la función hepática, llevando también a complicaciones de litiasis biliar. Se ha detectado disfunción hepática severa en algunos casos. La ictericia neonatal es un hallazgo frecuente en niños homocigotos o doble heterocigotos. La esplenomegalia es usual y no muy marcada. En determinados pacientes se presentan ulceraciones crónicas de extremidades inferiores.

El tratamiento es básicamente de soporte. Puede requerirse fototerapia y exanguinotransfusión. Las transfusiones constantes se requieren en casos severos crónicos y en la esplenectomía, para disminuir la hiperhemólisis. En sujetos politransfundidos se deben tomar en consideración los quelantes de hierro.

Hallazgos en Costa Rica y diagnóstico de laboratorio

El primer caso de deficiencia de PK en Costa Rica se describió en 1990. Fue diagnosticado en dos hermanos de la provincia de Guanacaste, con una larga historia de anemia hemolítica de origen oscuro. Un severo cuadro hemolítico con valores de Hb de 8 g/dl, con esplenomegalia, severa ictericia, la cual se consignó en el período neonatal, fueron algunas de las principales manifestaciones de la deficiencia. En uno de los propósitos, el cuadro hemolítico se exacerbó durante el período de embarazo, provocando cuadro de colitis y colangitis, requiriendo de cirugía.

En un segundo caso de deficiencia de PK diagnosticado, las características clínicas fueron muy distintas a las del primer caso. Este se presentó en una niña con larga historia de anemia hemolítica de origen desconocido; dicha anemia, en contraste con la anterior, fue ligera (Hb 12,9 g/dl); al igual que su ictericia, la esplenomegalia fue grado I, a diferencia del primer caso donde fue marcada.

En cuanto al laboratorio, se puede decir que no se encuentran alteraciones diagnósticas en la morfología de los eritrocitos, a pesar de que haya presencia de equinocitos y acantocitos, en especial después de la esplenectomía, con aumento en el cómputo de reticulocitos. Se presenta el perfil clásico de hemólisis con hiperbilirrubinemia, haptoglobinas bajas e incremento de DHL. La fragilidad osmótica está disminuida por el alto cómputo de reticulocitos, que son más resistentes. En la fragilidad post-incubación de 24 horas a 37 °C, se presenta un incremento, posiblemente producto del fallo en la bomba de sodio y potasio. La autohemólisis se presenta del tipo II

(no corrige con glucosa). Se muestran alteraciones en las concentraciones de algunos compuestos intermediarios, como el ATP que está disminuido y el 2,3 DPG aumentado.

La prueba del cianuro-ascorbato suele dar positiva, características que fueron, en los dos casos costarricenses, el indicio de la existencia de la deficiencia de PK. Se puede realizar además la prueba de escrutinio de manchas fluorescentes de Beutler y la medición de la actividad enzimática.

La determinación de la actividad de la PK es la forma precisa de establecer el diagnóstico de la deficiencia, así como la cuantificación del 2,3 DPG, el ATP y el 3PG evidencian la existencia del bloqueo metabólico, cuando están elevados el primero y el tercero, y disminuido el segundo. Los altos niveles de reticulocitos tienden a enmascarar la deficiencia de la enzima y se ha realizado, para obviar dicha interferencia, la medición de otras enzimas dependientes de reticulocitos, como la hexoquinasa, determinando la relación PK/HX o la separación de reticulocitos con gradientes de densidad (Percoll-Renografin). Se pueden analizar las mutaciones por medio de biología molecular.

Otras eritroenzimopatías

En el Cuadro N° 8 se resumen otras eritroenzimopatías, que son menos frecuentes. De estas se hace especial mención únicamente a la deficiencia de pirimidina 5' nucleotidasa (P5N), por ser una de las pocas eritroenzimopatías donde el frotis sanguíneo ofrece una ayuda importante. Esta enzimopatía cursa con un cuadro de punteado basófilo muy prominente, similar al que se observa en la intoxicación crónica por plomo. Se hereda en forma autosómica recesiva y los pacientes cursan con una hemólisis leve o moderada, con esplenomegalia.

Cuadro N° 8. Herencia y características clínicas de las eritroenzimopatías más frecuentes que originan anemia hemolítica y otros trastornos		
Enzima	Herencia	Características del cuadro hemolítico
Vía pentosas fosforadas		
G6PD(*)	Ligada al sexo	AHID (episódica) AHCNE Ictericia neonatal
Autosómica recesiva AHCNE	Autosómica recesiva	AHCNE
Autosómica recesiva AHCNE	Autosómica recesiva	AHCNE
Glutation sintetasa (***)	Autosómica recesiva	AHCNE
Vía glucolítica		
Hexoquinasa (**)	Autosómica recesiva	AHCNE (2,3 DPG ↓)
Glucosa-6-fosfato isomerasa (*)	Autosómica recesiva	AHCNE
Fosfoglicerato quinasa (**)	Ligada al sexo	AHCNE
Adolasa (****)	Autosómica recesiva	AHCNE, glucógeno en hígado, retardo mental
Trisosa fosfato isomerasa (**)	Autosómica recesiva	AHCNE, trastornos neuromusculares, arritmias e infecciones. Letal
Difosfato glicerato mutasa (****)	Autosómica recesiva	AHCNE 2,3 DPG
Fosfoglicerato quinasa (**)	Autosómica recesiva	AHCNE, problemas neurológicos
NADH-reductasa de la metaHb (*)	Autosómica recesiva	MetaHb-congénita
Piruvato quinasa (*)	Autosómica recesiva	AHCNE (acantocitos)
Metabolismo nucleótidos		
Pirimidina 5 nucleotidasa (***)	Autosómica recesiva	(punteado basófilo) retardo mental
Adenosina deaminasa (****)	Autosómica recesiva	AHCNE
Adenilato quinasa (****)	Autosómica recesiva	AHCNE

AHCNE: anemia hemolítica congénita no esferocítica; AHID: anemia hemolítica inducida por drogas; (*) más frecuentes; (**) condiciones raras; (***) muy raras; (****) excesivamente raras.

BIBLIOGRAFÍA

- Alvarado, E. Contribución al estudio de la G6PD eritrocítica. (Tesis de grado). Universidad de Costa Rica; 1966.
- Bain B. Disorders of red cells and platelets. En: Bain B (editor). *Blood Cells: a practical guide*. 4 ed. Massachusetts: Blackwell Publishing; 2006. p. 316-331.
- Bauer Jr. TR, Adler RL, Hickstein DD. Potential large animal models for gene therapy of human genetic diseases of immune and blood cell systems. *ILAR J* 2009; 50(2): 168-186.
- Bessis M. Blood sinears reinterpreted. New York Springer: Verlag; 1977.
- Bessis, M. *Living blood cells and their ultrastructure*. Berlin: Springer; 1973.
- Beutler A, Khul W, Sáenz GF, Rodríguez W. Mutation analysis of G6PD variants in Costa Rica. *Hum Genet* 1991; 87: 462-465.
- Beutler E. Glucose 6 phosphate dehydrogenase deficiency: a historical perspective. *Blood* 2008; 111; 116-124.
- Castro GAM, Snyder LM. G6PD San José: A new variant. Characterized by NADPH inhibition studies. *Humangenetik* 1974; 21: 361.
- Chang K, Williamson JR, Zarkowsky HS. Effect of heat on the circular dichroism of spectrin in hereditary pyropoikilocytosis. *J Clin Invest* 1979; 64: 326-328.
- Chaves M, Quintana E, Sáenz GF, Monge G, Aguero O, Montero A, Jiménez J. Ictericia neonatal y deficiencia de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa eritrocítica. Experiencia en Costa Rica. *Sangre* 1987; 32:428-435.
- Chaves M, Sáenz GF, Quintana E, Montero A, Jiménez J. Polimorfismo de la deshidrogenasa de la glucosa-6-fosfato "G6PD" eritrocítica en Costa Rica. *Sangre* 1988; 33(1): 12-14.
- Chaves M. Eritroenzimopatías en la ictericia neonatal. (Tesis de grado). Facultad de Microbiología. Universidad de Costa Rica; 1984.
- Chaves MA, Sáenz G. Cuadros de hemólisis por defectos de membrana. En: Sáenz GF (editor). 5 ed. San José: EDNASSS; 2008. P. 151-164.
- Chaves MA. Metabolismo eritrocítico y eritroenzimopatías En: Sáenz GF (editor). 5 ed. San José: EDNASSS; 2008. p. 177-193.
- Fico A, Paglialunga F, Cigliano L, Abrescia P, Verde P, Martini G, *et al.* Glucose 6 phosphate dehydrogenase plays a crucial role in protection from redox stress induced apoptosis. *Cell Death Diff* 2004; 11(8): 823-831.
- Gallagher PG. Disorders of the red blood cell membrane: hereditary spherocytosis, elliptocytosis, and related disorders. En: Lichtman MA, Beutler E, Kipps TO, Seligsohn U, Kaushansky K, Prchal JT (editores). *Williams hematology*. 7 ed. New York: McGraw-Hill Medical; 2006. p. 571-597.
- Gallagher PG. Red cell membrane abnormalities. En: Arcenci RJ, Hann IM, Smith OP (editores). *Pediatric hematology*. 3 ed. Massachusetts: Blackwell Publishing; 2006. p. 256-274.
- Gordon-Smith EC, Mohandas N. Hereditary disorders of the red cell membrane. En: Hoffbrand VA, Catovsky D, Tuddenham EGD, Green AR (editores). *Postgraduate hematology*. 5 ed. Malden MA: Blackwell Publishing; 2005. p. 126-137.
- Gordon-Smith EC. Disorders of red cell metabolism. En: Hoffbrand AV, Catovsky D, Tuddenham E (editores). *Postgraduate haematology*. 5 ed. London: Blackwell; 2005. p. 133-48.
- Luzzatto L, Seneca E. G6PD deficiency: a classic example of pharmacogenetics with on-going clinical implications. *Brit J Hematol* 2013; 164: 469-480.
- Meléndez C, Duncan Q. *El negro en Costa Rica*. 3 ed. 1972.
- Mohandas N, Gallagher P. Red cell membrane: past, present, and future. *Blood* 2008; 112(10): 3939-3948.
- Ondei LS, Silveira LM, Leite A, Souza D, Pinhel R, Percário S, *et al.* Lipid peroxidation and antioxidant capacity of G6PD patients with A-(202G>A) mutation. *Gen Med Res* 2009; 8(4): 1345-1351.
- Price E, Otis S, Scriver S. Red cell enzymopathies. En: Hoffman R (editor). *Hematology basic principles and practice*. 6 ed. Philadelphia: Elsevier-Saunders; 2013. p. 581-591.
- Rank G, Sutton R, Marshall V, Lundie RJ, Caddy J, Romeo T, *et al.* Novel roles for erythroid Ankyrin-1 revealed through an ENU-induced null mouse mutant. *Blood* 2009; 113(14): 3352-3362.
- Sáenz GF, Chaves M, Barrantes A, Elizondo J, Montero A, Yoshida A. Glucose-6-phosphate dehydrogenase variant Gd (-) Santamaría found in Costa Rica. *Act Haemat* 1984; 72: 37-40.
- Sáenz GF, Chaves M, Briceño J, Quintana E, Arroyo G, Valenciano E, *et al.* Polimorfismo de la hemoglobina y de la G-6-PD eritrocítica en población preescolar de Santa Cruz, Guanacaste, Costa Rica. *Rev Costarric Cienc Méd* 1985; 6(3): 126-130.
- Sáenz GF, Elizondo J, Arroyo G, Valenciano E, Rojas LF, Jiménez J, *et al.* Hemoglobinopatías en 12.000 escolares costarricenses. *Acta Med Costarric* 1980; 23: 89-99.
- Santana M, Monteiro W, Siqueira A, Costa MF, Sampaio V, Lacerda MV, *et al.* Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient variants are associated with reduced susceptibility to malaria in the Brazilian Amazon. *Trans R Soc Med Hyg* 2013; 107(5): 301-306.
- Zarkowsky HS, Mohandas N, Speaker CB, Shohet SB. A congenital hemolytic anaemia with thermal sensitivity of the erythrocyte membrane. *Br J Haematol* 1975; 29: 537-543.
- Zomer M, Elizondo J, Quesada E. Análisis de 11 casos de Beta talasemia en Costa Rica. *Acta Méd Cost* 1973; 2: 129-133.

Dr. Miguel A. Rodríguez Pineda
Dr. Juan E. Richmond Navarro

INTRODUCCIÓN

Un estado hemolítico se presenta cuando la supervivencia *in vivo* de los eritrocitos está acortada; los síntomas y signos clínicos se manifiestan hasta cuando la capacidad compensatoria de la médula ósea es superada por la destrucción de los eritrocitos. En estos casos los cuadros son regenerativos.

La mayoría de los procesos hemolíticos ocurren a nivel extracelular, es decir, en las células fagocíticas del bazo, hígado y la médula ósea.

En general, la hemólisis tiene su origen en dos tipos de anomalías:

- a. Intrínsecas, al interior de los eritrocitos, por defectos de la molécula de hemoglobina o enzimas, o de su membrana celular por problemas de permeabilidad, estructura o contenido de lípidos; todos defectos hereditarios.
- b. Extraeritrocitarias o defectos adquiridos, tales como lesiones físicas (quemaduras, ejercicio, cambio de válvula o problemas de micro circulación, etc.); infección por microorganismos intracelulares como la malaria o presencia de anticuerpos séricos alo o autoinmunes.

Las anemias hemolíticas adquiridas se pueden diferenciar de las hereditarias a través de los antecedentes heredo-familiares y el historial clínico del paciente. También la investigación clínica ayuda a establecer el tipo de anemia adquirida hemolítica; de tal forma, un interrogatorio sobre su procedencia (para saber si proviene de una zona endémica de paludismo) y la caracterización de su trabajo o de sus hábitos (para determinar la posibilidad de exposición a plomo), permiten a la vez la correcta clasificación.

Los hematíes anómalos o los cubiertos con anticuerpos son fagocitados en el bazo, por lo que el paciente puede presentar esplenomegalia, seguida de la reducción de los glóbulos rojos (anemia).

Las anemias hemolíticas inmunes son, por tanto, de tipo adquirido. En estas condiciones patológicas, los

eritrocitos pueden estar recubiertos de anticuerpos de las clases IgG o IgM, principalmente, o de fracciones de complemento. Dependiendo de la proteína que el eritrocito presente adherida a su membrana, se desencadenará un mecanismo diferente para la destrucción de dicha célula. Cuando las proteínas involucradas son la IgG y la molécula C₃ del complemento, las células serán removidas por el bazo, mientras que cuando es la IgM se puede desencadenar una hemólisis intravascular. Este tipo de hemólisis es menos frecuente y cursa con hemoglobinuria, dado a que la hemoglobina liberada al plasma supera la capacidad fijadora de haptoglobina. La hemoglobina es reabsorbida en las células de los túbulos renales donde el hierro se transforma en hemosiderina, una parte de la cual es asimilada para su reutilización y la otra llega a la orina. Los pigmentos de la hemo y la mioglobina son tóxicos para los túbulos renales, por lo que la hemólisis intravascular puede desencadenar, entre otros mecanismos fisiopatológicos, fallo renal.

Las manifestaciones sistémicas de las anemias hemolíticas son parecidas a las observadas por otros tipos de anemia; sin embargo, las crisis hemolíticas se caracterizan por un cuadro de fiebre, escalofríos, dorsalgias, dolor abdominal, postración y shock. Además, la hemólisis grave se acompaña de anemia, ictericia, niveles de deshidrogenasa láctica aumentada, reticulocitosis, esplenomegalia e incluso, hemoglobinuria. Se debe realizar diagnóstico diferencial con hepatitis y reacción post-transfusional.

Hallazgos generales de laboratorio en anemias hemolíticas

En anemias hemolíticas, los análisis de laboratorio se caracterizan por lo siguiente:

- a. La hemoglobina se encuentra disminuida y el valor del VCM está incrementado.
- b. Reticulocitos aumentados.
- c. La morfología de los glóbulos rojos puede mostrar los hallazgos de hemólisis: punteado basófilo, cuerpos de Howell Jolly, esquizocitos u otras formas, dependiendo del tipo de anemia hemolítica que se trate.
- d. Hemoglobinemia.

- e. Hemoglobinuria.
- f. Bilirrubina indirecta aumentada.
- g. Pruebas de función hepática normales.
- h. Haptoglobinas disminuidas.

Para diferenciar entre anemias hemolíticas hereditarias y adquiridas se requiere incluir otras pruebas:

- a. Fragilidad osmótica (esferocitosis hereditaria).
- b. Electroforesis de hemoglobina (hemoglobinopatías, HbS, HbC, talasemia).
- c. Prueba de hemólisis con sacarosa (hemoglobinuria paroxística nocturna).
- d. Prueba de directa de antiglobulina (anemia hemolítica autoinmune).
- e. Aglutininas frías (síndrome de aglutininas frías).

ANEMIA HEMOLÍTICA AUTOINMUNE (AHAI)

Características

Las anemias hemolíticas autoinmunes se desarrollan en personas con una respuesta inmune anormal, las cuales producen autoanticuerpos capaces de lisar sus propios glóbulos rojos. Su clasificación se muestra en los cuadros N° 1 y N° 2.

El estímulo desencadenante a veces se desconoce (causa idiopática) y en otros casos es secundario a agentes infecciosos, medicamentos, neoplasias o collagenopatía.

Cuadro N° 1. Clasificación de la AHAI

a. Idiopáticas o primarias: Enfermedad hemolítica no asociada a otra patología.
b. Secundarias: Enfermedad hemolítica relacionada con alguna otra enfermedad bien caracterizada.
Características del anticuerpo involucrado:
a. Por autoanticuerpos calientes (Ac-calientes): La máxima actividad de los autoanticuerpos se da a la temperatura de 37 °C.
b. Por autoanticuerpos fríos (Ac-fríos): La máxima actividad de los autoanticuerpos ocurre a temperaturas inferiores a 30 °C.

Cuadro N° 2. Clasificación de las anemias hemolíticas inmunes

a. Anticuerpos calientes 1. Idiopáticas (30-50%). 2. Secundaria: a. Procesos infecciosos. b. Procesos linfoproliferativos (LLC, Linfoma Hodgkin). c. Procesos autoinmunes (LES, Síndrome de Evans -esta última entidad es cuando coexisten la AHAI y la trombocitopénica inmunológica (PTI)-).
b. Síndrome de aglutininas frías 1. Idiopáticas. 2. Secundaria: i. Asociado con leucemia linfocítica crónica, linfomas, etc. ii. Asociado con <i>Mycoplasma pneumoniae</i>.

Cuadro N° 2. Clasificación de las anemias hemolíticas inmunes
c. Hemoglobinuria paroxística al frío 1. Idiopáticas. 2. Secundaria: i. Síndromes virales. ii. Sífilis.
ANEMIAS HEMOLÍTICAS INMUNES POR DROGAS
a. Mecanismo de hapteno. b. Mecanismo de desregulación de la membrana. c. Mecanismo complejo antígeno anticuerpo. d. Mecanismo de desregulación central.
ANEMIAS HEMOLÍTICAS INMUNES INDUCIDAS POR ALOANTICUERPOS
a. Enfermedad hemolítica del recién nacido. b. Reacciones hemolíticas post-transfusión intravasculares o extravasculares.

La mejor manera de enfocar la AHAI es analizar el tipo de anticuerpos involucrados en el proceso de hemólisis. Para ello, se debe tener presente que existen dos clases principales de anticuerpos que producen hemólisis: IgG e IgM. La forma de depuración de los eritrocitos sensibilizados, el sitio de destrucción, la temperatura óptima de reacción, el comportamiento de estos al tratamiento y su pronóstico, guardan relación con la clase de anticuerpo antieritrocítico que genera el problema.

La anemia hemolítica autoinmune se manifiesta en forma extravascular cuando el anticuerpo es IgG, siendo el hígado y el bazo los que depuran las células recubiertas de anticuerpos. Cuando el anticuerpo es IgM la reacción es intravascular, debida a la activación del Sistema de Complemento.

En cuanto a la etiología primaria de la AHAI, existe un gran número de teorías al respecto, las cuales se podrían resumir en dos tendencias principales:

- a) La primera propone un cambio en la membrana del eritrocito, que condiciona la modificación de un antígeno normal, por la intervención de agentes exógenos de tipo infeccioso, que originarían una reacción cruzada contra los antígenos normales, esto en presencia de un sistema inmune normal. Quizás uno de los ejemplos más conocidos es la reacción cruzada del *Mycoplasma pneumoniae*, que estructuralmente se asemeja al antígeno I de los eritrocitos humanos.

- b) La segunda teoría se basa en la alteración en el sistema inmunológico, que por alguna razón, todavía poco conocida, rompe la capacidad de autoreconocimiento de los antígenos propios.

Hallazgos de laboratorio

Los análisis de laboratorio muestran el siguiente patrón:

- a. Fórmula roja: anemia macrocítica.
- b. Reticulocitos mayor a 5%; en adultos puede estar entre 10-50%.
- c. Bilirrubina indirecta aumentada o mayor a 2 mg/dl.
- d. Hemoglobinuria (en casos de hemólisis intravascular).
- e. Haptoglobinas disminuidas o ausentes (en casos de hemólisis intravascular).
- f. Antiglobulina directa positiva.
- g. Pruebas de función hepática normales.
- h. Recuento de leucocitos y plaquetas normales.
- i. Morfología de glóbulos rojos anormal: esquizocitos (fragmentos de eritrocitos), esferocitos, presencia de eritrocitos jóvenes (cuerpo Howell Jolly, basofilia difusa, punteado basófilos, eritroblastos).

En ocasiones puede presentarse autoaglutinación, que se visualiza por la formación de grumos dentro del tubo o al frotis. Es importante enfatizar que los cuadros de autoaglutinación pueden alterar los parámetros hematológicos obtenidos con analizadores automáticos. Las plaquetas pueden estar normales o ligeramente disminuidas. Aunque la reticulocitosis

es un hallazgo casi constante, existen reportes de casos con episodios de reticulocitopenia, a pesar de tener una médula ósea intensamente eritroide, lo cual sugiere eritropoyesis ineficaz o aplasia.

Cuando se tiene una prueba directa de antiglobulina positiva, se debe caracterizar con sueros monovalentes el tipo de proteína que se encuentra en la membrana del eritrocito, IgG, C3b o d, IgM o IgA. Además, es obligatorio aplicar la técnica de elusión que permitirá rescatar el anticuerpo sensibilizador y demostrar la especificidad.

La clasificación más utilizada de estos síndromes clínicos y quizás la que más se ajusta a los propósitos inmunohematológicos es la basada en la reactividad térmica del anticuerpo que provoca la hemólisis; lo que las clasificaría en anemia hemolítica autoinmune por anticuerpos calientes (IgG) y la de anticuerpos fríos (IgM) (tal como se indicó en los cuadros N° 1 y N° 2).

ANEMIA HEMOLÍTICA AUTOINMUNE POR ANTICUERPOS CALIENTES

Por lo general, el anticuerpo participante es IgG, usualmente de los subtipos IgG₁ e IgG₃, en un ámbito de acción de 37 °C. Dichos anticuerpos pueden o no fijar la molécula C₃ del complemento. Su especificidad suele ir dirigida a proteínas de la membrana del glóbulo rojo; es por ello que con los métodos tradicionales de identificación de anticuerpos (paneles de eritrocitos) no se logra definir una especificidad, ya que tienden a aglutinar todas las células. Esta característica es la que les permite denominarlos anticuerpos multiaglutinantes o panaglutinantes.

La prueba de antiglobulina puede resultar negativa, debido a la baja concentración de anticuerpos sobre la membrana de glóbulo rojo; se estima que se requieren densidades mayores a 200 moléculas para obtener una prueba positiva con los reactivos comerciales. Este hecho se puede solucionar con el tratamiento enzimático de los eritrocitos al momento de realizar la determinación de antiglobulina.

Desde el punto de vista clínico, en la anemia hemolítica autoinmune por Ac-calientes el cuadro hemolítico es muy variable: desde una hemólisis inaparente que solo se evidencia por estudios de sobrevivencia eritrocítica, hasta una hemólisis fulminante que compromete la vida del paciente.

En contraste con el limitado conocimiento que se tiene de la etiología de las AHA, se ha logrado comprender mejor los mecanismos de destrucción de glóbulos rojos en los que intervienen autoanticuerpos. Parece

ser que el mecanismo clásico de hemólisis por fijación de complemento no es fundamental para la destrucción *in vivo* de las células, aunque algunos componentes del complemento, particularmente C₃ y C₄, pueden encontrarse adheridos a la superficie en las AHAI de tipo Ac-calientes. La fragmentación de los glóbulos rojos y la eritrofagocitosis son los procesos que parecen participar con mayor relevancia, siendo la fragmentación el mecanismo principal de daño y destrucción del eritrocito en casi todos los estados hemolíticos congénitos adquiridos.

La hemólisis por fragmentación depende de una serie de fuerzas físicas y funciones fisiológicas; el eritrocito es convertido en un microesferocito que se remueve de manera rápida de la circulación, principalmente en la microcirculación esplénica. El esferocito se forma luego de haber perdido la superficie de membrana en relación con su contenido, por acción de las células fagocíticas del sistema retículo endotelial, ya que poseen receptores que reaccionan específicamente con IgG, complemento o ambos. Se ha determinado que en el 80% de los pacientes, la IgG₃ sola o en combinación con otras subclases, es el anticuerpo responsable; le sigue la IgG₁ con un 15% de los casos; algunas pocas veces se halla IgG₂; y con la IgG₄ no se reporta anemia hemolítica manifiesta.

El grado de hemólisis de los pacientes no se asocia al subtipo de inmunoglobulina involucrado, pues dentro de una misma subclase existe variabilidad en un cuadro hemolítico. Se encuentra una relación directa entre la cantidad de anticuerpo presente sobre la membrana del glóbulo rojo y el grado de hemólisis. La eritrofagocitosis es un hallazgo muy frecuente en los pacientes con AHAI activa y es fácilmente observable en las células fagocíticas del bazo, y en ocasiones en la médula ósea, los nódulos linfáticos y el hígado. Se ha visto que con altas concentraciones de anticuerpo, las células del sistema reticuloendotelial hepático (células de Kupffer) inician la función fagocítica, aumentando el proceso. El tipo de antígeno, su concentración en la membrana, su disposición y movilidad, son los factores que tal vez influyen en la inducción de la eritrofagocitosis.

Los esferocitos resultantes pueden ser inestables osmóticamente, aun a la tonicidad normal del plasma, lo que conlleva a hemólisis coloidosmótica intravascular.

A pesar de que la sensibilización de los eritrocitos por inmunoglobulina o complemento parece ser una parte necesaria del mecanismo hemolítico de la AHAI, también pareciera que otros factores, hasta ahora desconocidos, están relacionados con el inicio y la

desaparición de la hemólisis y su severidad. Esto se sugiere por la observación frecuente de pacientes que poseen una prueba de antiglobulina directa fuertemente positiva, sin que haya destrucción aumentada de glóbulos rojos. Una rápida hemólisis puede iniciarse entonces de forma repentina, sin que se presenten hallazgos serológicos significativamente alterados. De allí que los pacientes con cuadros serológicos comparables pueden hemolizar a muy diferente tasa. Por último, las remisiones pueden aparecer de manera abrupta de nuevo y sin que haya cambios serológicos importantes.

ANEMIA HEMOLÍTICA AUTOINMUNE POR ANTICUERPOS FRÍOS

AHA tipo aglutininas frías

La mayoría de las personas presentan anticuerpos fríos, con títulos bajos y sin significado clínico; sin embargo, los pacientes con altos títulos (mayores a 1:100) pueden desarrollar una hemólisis activa cuando son sometidos a temperaturas bajas, como en cirugía extracorpórea, visita a sitios de mucha altura o bajas temperaturas. Para que se inicie el evento hemolítico, estos anticuerpos deben presentar un amplio rango térmico (capacidad de actuar hasta 30 °C); esto provoca su activación cuando la sangre circula por sitios distales, como en los dedos, las orejas, la nariz y en áreas de exposición al frío. El mecanismo de destrucción todavía no es conocido en su totalidad, pero se sabe que incluye la activación de componentes líticos del complemento, así como fagocitosis y secuestro de eritrocitos aglutinados, fundamentalmente en el hígado. Está demostrado que dicho secuestro es facilitado por la presencia de la fracción C₃b.

El anticuerpo IgM en la enfermedad por criohemaglutininas suele estar dirigido contra el sistema de grupos sanguíneos Ii o antígenos relacionados de la membrana del eritrocito humano. La hemólisis tiende a ser intensa, debido a la capacidad aglutinante de la molécula de IgM.

Entre las especificidades involucradas se encuentran: anti I, i, P y Pr.

Hemoglobinuria paroxismal al frío (HPF)

Representa entre un 5-10% de las anemias hemolíticas por anticuerpos fríos y cursa con hemoglobinuria posterior a la exposición al frío, debido a la activación de los anticuerpos que fijan complemento. Fue descrita por Donald-Landsteiner y Ehrlich. Es común en individuos que han padecido de sífilis.

El anticuerpo es del tipo IgG bifásico: reacciona con los eritrocitos a temperaturas inferiores a los 20 °C y provoca lisis por complemento cuando los glóbulos rojos sensibilizados llegan a la circulación central. Este anticuerpo, dirigido por lo general contra el antígeno P, es de difícil detección y se reconoce comúnmente como anticuerpo de Donald-Landsteiner.

ANEMIA HEMOLÍTICA INDUCIDA POR DROGAS (AHID)

La administración de medicamentos puede provocar la aparición de una gran variedad de anormalidades hematológicas, entre ellas la anemia hemolítica inducida por drogas (AHID).

Alrededor de un 16-18% de las anemias hemolíticas adquiridas corresponden a este tipo. Es conocido que algunos compuestos químicos pueden causar anemia hemolítica con prueba directa de antiglobulina positiva, hecho demostrado al observar a un paciente tratado con estibofeno, droga usada para el tratamiento de la esquistosomiasis. Posteriormente, se han encontrado otros compuestos capaces de ocasionar lo mismo, aunque mediante diferentes mecanismos.

Clasificación

En la actualidad estas anemias se clasifican en cuatro grupos, según el mecanismo de acción de la droga:

•γ Mecanismo tipo complejos inmunes

Las drogas actúan uniéndose a una proteína plasmática, estimulando así el sistema inmune. Los anticuerpos formados reaccionan contra el complejo proteína-hapteno en el plasma, y estos se depositan sobre los eritrocitos. Dichos complejos activan el complemento sobre el eritrocito.

En este último caso, el complemento activado se deposita también sobre los eritrocitos, cuyo papel sería el de "inocentes observadores". En ambos casos, los glóbulos rojos se aglutinan en presencia de un suero anti-C₃, que demuestra la participación del complejo en el proceso. Los anticuerpos formados contra el hapteno pueden ser tanto IgM como IgG.

Las drogas que pueden generar este mecanismo de hemólisis son: las quininas, las sulfonamidas, los derivados de la sulfanilurea, de la fenacetina, PAS y otras.

•γ Mecanismo tipo hapteno

La penicilina y otras drogas, como cefalosporinas y

tetraciclinas, son capaces de causar hemólisis inmune en pacientes a los que se les administran altas dosis por vía intravenosa. En este mecanismo la droga también actúa como hapteno, se une covalentemente a algunas proteínas de la membrana del glóbulo rojo, adquiriendo así la antigenicidad necesaria para que se sintetice una molécula de IgG dirigida contra los glóbulos rojos recubiertos de penicilina. En algunos casos puede participar la IgM; sin embargo, es inocuo. Aun así, se reporta el caso de un cuadro hemolítico agudo por Ac-IgM antipenicilina en un niño de tres años que estaba recibiendo tratamiento por vía oral.

La prueba directa de antiglobulina es positiva, mientras que el eluido y las pruebas pretransfusionales son negativas. La hemólisis finaliza al suspender el medicamento.

Es importante señalar que el término “autoinmune” es inapropiado para designar ambos modelos hapténicos, por el hecho de que los anticuerpos producidos son específicos contra un componente exógeno (la droga) y no contra componentes propios del glóbulo; así pues, el mecanismo debería ser designado como un proceso “inmune”. Los eritrocitos sensibilizados son secuestrados por el sistema reticuloendotelial. El complemento no está involucrado en el mecanismo y la hemólisis intravascular raramente ocurre.

•γ **Mecanismo desconocido**

La droga antihipertensiva aldomet o alfametildopa, es la que con más frecuencia induce hemólisis inmune, y el total de casos reportados supera al de todas las otras drogas descritas. Fue señalado su papel por primera vez en 1966 y, paradójicamente, su mecanismo de acción aún no ha sido esclarecido. Se sabe que los anticuerpos formados son IgG y que poseen especificidad para los antígenos del sistema Rh₀. La prueba de antiglobulina es positiva. El desarrollo de los anticuerpos es dependiente de la dosis de droga. Entre un 11% y un 40% de los pacientes tratados con alfametildopa desarrollan prueba de antiglobulina positiva, según la dosis diaria. Sin embargo, menos del 1% de las personas con dicha prueba positiva desarrollan una anemia hemolítica significativa. Esto se debe a que los anticuerpos poseen una afinidad muy baja hacia los antígenos del eritrocito, por lo cual se detecta un gran número de pacientes con la prueba de antiglobulina positiva, sin que muestre un cuadro hemolítico clínico.

El cuadro clínico y de laboratorio de hemólisis no se diferencia de una AHA por anticuerpos calientes; el diagnóstico lo establece la historia clínica del paciente, con el antecedente de ingesta de Aldomet[®].

•γ **Mecanismo de adherencia inespecífica**

Este mecanismo implica la adherencia inespecífica (no inmunológica) de una proteína sérica normal a la membrana eritrocítica, luego de que la droga se une a dicha membrana y la modifica. Como consecuencia, la prueba directa de antiglobulina puede ser positiva para la IgG y la C₃. Los eritrocitos modificados por la cefalosporina, si se incuban en un plasma normal, se llegan a recubrir de albúmina, IgG, IgA, IgM, Alfa-1-anti-tripsina, alfa-2-macroglobulina y fibrinógeno. Las células recubiertas por dichas proteínas pueden activar el complemento o ser eliminadas por el sistema reticuloendotelial.

A pesar de que se tiene una prueba de antiglobulina positiva, el eluido es negativo, y si se requiere hacer una prueba pretransfusional esta será compatible. El cuadro clínico resuelve cuando se suspende el medicamento. Este cuadro no se considera una anemia hemolítica inmune verdadera.

Cuadro clínico en la AHID

La hemólisis ocurre en presencia del medicamento. En la mayoría de los pacientes hay un cuadro de hemólisis intravascular agudo con hemoglobinemia y hemoglobinuria. Se observa alta incidencia de fallo renal, así como coagulación intravascular diseminada. Los hallazgos de laboratorio son muy similares a los de una AHA por anticuerpos calientes. Ocasionalmente, puede acompañarse de leucopenia, trombocitopenia o ambas. El cuadro hemolítico, como se ha mencionado, es muy variable en cuanto a su gravedad.

Diagnóstico

Las observaciones iniciales en un posible paciente con este tipo de problema son básicamente las mismas que en AHA, e incluyen anemia macrocítica, reticulocitosis, haptoglobinas disminuidas o ausentes, fragilidad osmótica incrementada, autohemólisis aumentada y sobrevida eritrocítica disminuida, con médula ósea de reacción eritroblástica. La prueba de antiglobulina directa positiva, con estudio de anticuerpos negativo y con historia de ingesta de medicamentos con el potencial hemolítico.

El tratamiento de elección en estos problemas se basa fundamentalmente en la eliminación de la terapéutica con las drogas que el paciente haya recibido, en especial con aquellas de conocido efecto inductor inmune.

En pacientes en tratamiento con alfametildopa, si no hay evidencia de un estado de hemólisis severa, no

es necesario que este sea discontinuado, aunque las pruebas de antiglobulina sean positivas.

La terapéutica con esteroides es de poco valor en este grupo de pacientes, aunque en casos resistentes puede ser de beneficio, especialmente cuando la alfametildopa está involucrada. No obstante, hay que considerar el cuidado con que se debe manejar a los pacientes hipertensos si se les administra esteroides. La transfusión sanguínea puede ser empleada en algunos casos, sobre todo en aquellos donde se presenta inestabilidad hemodinámica.

Tratamiento

La primera línea de tratamiento en la anemia hemolítica autoinmune son los esteroides, con el fin de tener hemoglobinas mayores a 10 g/dl. Este objetivo debe lograrse en término de tres meses; en caso de no lograrlo, se deben mantener dosis máximas de 15 mg día y considerar terapia de segunda línea, que consiste en la esplenectomía, a lo cual no todos los pacientes son candidatos (en caso de que esto ocurra se puede considerar el uso de Rituximab, un anti-CD-20).

La transfusión de glóbulos rojos solo se indica cuando el paciente presenta inestabilidad hemodinámica o dolor torácico y debe seleccionarse la sangre menos incompatible, asegurando que no se encuentre encubierto un aloanticuerpo.

En casos de pacientes refractarios a primera y segunda línea, se puede usar ciclofosfamida.

ANEMIAS HEMOLÍTICAS POR ALOANTICUERPOS

Anemia hemolítica del recién nacido

La incompatibilidad sanguínea materno-fetal ocasiona una anemia hemolítica autoinmune en el recién nacido, dado a que el feto presenta un antígeno eritrocitario que la madre carece. Este tipo de anemias se agrupa en tres categorías, según la especificidad de los anticuerpos antieritrocitos:

- Por anticuerpos contra antígenos del sistema sanguíneo ABO.
- Por anticuerpos contra el antígeno sanguíneo Rho(D).
- Por anticuerpos contra antígenos diferentes al D. En este grupo se encuentran antígenos del sistema Rh (CcEe) y de otros sistemas de grupos sanguíneos, tales como: Kell-cellano, Duffy y Kidd.

Este diagnóstico requiere diferenciarse de otras entidades que pueden generar hemólisis en el periodo neonatal, tan severas que pueden causar

eritroblastosis fetal; por ejemplo, los defectos intrínsecos del eritrocito, como la esferocitosis hereditaria, la deficiencia de la deshidrogenasa de la glucosa 6 fosfato, la piruvato quinasa y los cuadros homocigotos de hemoglobinas anormales y de talasemias. Asimismo, puede observarse anemia hemolítica en el recién nacido con septicemia o con algunas infecciones virales congénitas, tales como la enfermedad por citomegalovirus o el herpes simple generalizado.

La enfermedad hemolítica del recién nacido se define como un cuadro hemolítico causado por un isoanticuerpo materno. La producción de estos anticuerpos siempre está asociada a embarazos o transfusiones previas.

La frecuencia de la etiología de la enfermedad hemolítica del recién nacido en orden descendente es: anti-AB, anti-D y anticuerpos no anti-D. Mientras que la severidad del cuadro en el mismo orden es: anti-D, anticuerpos no anti-D y anti-AB.

Enfermedad hemolítica del recién nacido por el sistema sanguíneo ABO

Esta entidad se caracteriza porque se puede manifestar desde el primer embarazo, debido a que los humanos tienen anticuerpos anti-AB desde los dos años de vida. Dichos anticuerpos se desarrollan porque los antígenos de este sistema se comparten con las bacterias que habitan en el intestino y con células vegetales, lo cual genera que las personas produzcan anticuerpos del tipo IgM, contra los antígenos que no poseen. La respuesta a base de anticuerpos de tipo IgG contra estos antígenos puede requerir de eventos tan cotidianos como la vacuna contra el tétanos e infecciones por *Toxocara*, por lo que la mujer puede presentar el cuadro desde el primer embarazo.

A pesar de que en aproximadamente un 20% de los nacimientos existe incompatibilidad ABO entre madre y feto, la incidencia de enfermedad hemolítica del recién nacido que requiere tratamiento es muy baja. Esto se fundamenta en que los antígenos de este sistema, que son glicolípidos al momento del nacimiento, permanecen en baja densidad cuando se encuentran unidos a la membrana del eritrocito. Además, los antígenos que se expresan en forma de glicoproteínas se pueden encontrar solubles en los diferentes fluidos corporales, cuando la persona ha heredado el gen del sistema secretor. Las dos condiciones anteriores permiten que cuando los anticuerpos logran atravesar la placenta, no encuentren antígenos en altas concentraciones en el glóbulo rojo o hallen el antígeno soluble, lo que permite neutralizar los anticuerpos y que las manifestaciones clínicas sean menores.

Los cuadros clínicos de enfermedad hemolítica del recién nacido se presentan solo en madres de grupo O que tienen hijos de grupos A y B; se plantea que únicamente las personas de dicho grupo pueden desarrollar anticuerpos anti-A y anti-B de tipo IgG, el resto solo presentan anticuerpos de tipo IgM, la cual imposibilita el paso a nivel placentario.

Enfermedad hemolítica del recién nacido por antígeno sanguíneo Rho(D)

En esta entidad sí se requiere de una segunda exposición al antígeno sanguíneo. Debido a que la circulación fetal es independiente de la materna, el contacto del antígeno extraño fetal con el sistema inmune materno, generalmente ocurre al momento del parto, durante el alumbramiento. En estas circunstancias pueden pasar desde 0,25 ml hasta 20 ml de sangre a la circulación materna, y producirse la inmunización. El 10-15% de las mujeres Rh-negativas con maridos Rh-positivos se sensibilizan. Cabe mencionar otra posibilidad de inmunización que ocurre al transfundir sangre Rho(D)+ a un individuo Rho(D-), donde el 70% de estos casos quedan inmunizados o sensibles. Debe hacerse notar que la inmunización por transfusión es poco frecuente, por las pruebas pretransfusionales que se realizan.

La inmunización de la madre (o del paciente transfundido) implica la producción de anticuerpos anti-Rho(D) o de cualquier otro sistema. Al principio son IgM, pero las características bioquímicas de los antígenos (proteínas) facilitan la producción de IgG, específicamente de las subclases IgG1 e IgG3. Solo los anticuerpos tipo IgG son capaces de atravesar la placenta. Estos anticuerpos son llamados aloanticuerpos, porque reaccionan con eritrocitos de la misma especie, pero no contra los eritrocitos del individuo que los produce. Los aloanticuerpos maternos del tipo IgG atraviesan la placenta y reaccionan contra los eritrocitos del feto, recubriendo su membrana. Esto genera su destrucción al pasar por el sistema monocítico-macrofágico (sistema reticuloendotelial).

Las características clínicas de esta enfermedad van a depender de los tipos de anticuerpos involucrados; en ambos casos pueden llegar a ser muy graves si el médico no interviene de manera pronta. Si el anticuerpo es de tipo IgG1 suele haber anemia severa, que induce a hipoxia, la cual afecta al endotelio y a los hepatocitos (disminución en la síntesis de albúmina), provocando un edema generalizado, donde su máxima manifestación es el *Hydrops fetalis*. Se observa un aumento en la hematopoyesis extramedular, con presencia de eritroblastos y leucocitos inmaduros en sangre periférica, condición

por la que se le denomina eritroblastosis fetal. Se encuentra un índice de reticulocitos bastante elevado; el neonato muestra hepato-esplenomegalia y a veces falla cardiorrespiratoria. La insuficiencia cardíaca es el evento que lleva al feto a la muerte, y si el obstetra no interviene oportunamente los embarazos culminan con un óbito fetal.

Cuando el anticuerpo que interviene es el IgG3, el hallazgo casi constante es la ictericia y puede alcanzar cifras de bilirrubina sérica superiores a los 20-30 mg/dl, que pueden provocar el kernicterus. Este último se desarrolla dependiendo de los siguientes parámetros: cifras de bilirrubina indirecta, peso y talla, velocidad de aumento de la bilirrubina y el estado general de salud del niño. Si se instaura produce daño neurológico, sordera, retardo mental, espasticidad y afectación motora.

Diagnóstico de laboratorio

Marcadores genéticos familiares como el grupo ABO y Rh₀(D) de los padres, constituyen una gran ayuda para la anticipación de un problema hemolítico por incompatibilidad materno-fetal. Por esto, es recomendable tipificar de rutina los grupos sanguíneos de todas las mujeres embarazadas, así como el de sus cónyuges.

La segunda prueba necesaria es la detección de anticuerpos irregulares, la cual está recomendada en toda paciente embarazada, independiente del grupo sanguíneo Rh₀(D) que esta posea; lo anterior se fundamenta en que la etiología de esta enfermedad contempla la posibilidad de que intervengan anticuerpos diferentes al anti-D.

Cuando a la paciente se le detecte un aloanticuerpo, independientemente de la especificidad de este, debe realizarse un control frecuente del título de anticuerpos para tener la opción de demostrar la seroconversión (titulación de la antiglobulina indirecta).

Si se demuestra un anti-D en el suero de la paciente embarazada, la sangre del marido debe estudiarse para determinar también su genotipo para el sistema Rh-Hr (por ejemplo, homocigota D/D o heterocigota D/d). Además, es mandatario examinar el líquido amniótico, determinando la concentración de bilirrubina en forma indirecta. Dicha valoración se debe hacer utilizando la gráfica de Liley, para comparar la concentración de bilirrubina versus la edad gestacional del feto.

El análisis del líquido amniótico redujo los óbitos fetales de un 20% a un 10%, y permitió identificar aquellos fetos que requieren de una inducción temprana

del parto, o por lo contrario, aquellos que pueden permanecer en útero hasta el término del embarazo. Puede realizarse además un ultrasonido ginecológico para evaluar ascitis en el feto.

Después del nacimiento, el neonato debe someterse a una exploración física exhaustiva, para demostrar un cuadro icterico de evolución temprana (antes de 24 horas) y signos de hemólisis, palidez, hepato-esplenomegalia, edemas, etc. También requerirá la prueba de antiglobulina directa, para demostrar la sensibilización del eritrocito; en caso positivo, se necesitará la prueba de eluido, para identificar el anticuerpo involucrado en la hemólisis. El diagnóstico se complementa con estudios del suero de la madre.

El frotis sanguíneo de la sangre del recién nacido demostrará signos de hemólisis como: macrocitos policromatófilos y eritroblastos. Otros hallazgos clásicos son la cifra de reticulocitos elevada (mayor de 5%), cifras bajas de hemoglobina respecto a lo esperado (menor a 16 g/dl) y la rápida elevación de bilirrubina sérica en las horas consecutivas al nacimiento, pues la hemólisis prosigue y sobrepasa la capacidad hepática de conjugación.

Tratamiento y prevención

El tratamiento que se le brinda al feto va a depender de la edad gestacional al momento en que se detecte la severidad del cuadro hemolítico; para ello se utiliza el análisis de líquido amniótico y la interpretación de acuerdo a Liley. Si fuera antes de las 32 semanas, la terapéutica de elección sería la transfusión intrauterina fetal; en edades gestacionales superiores lo que procede es madurar el pulmón fetal e inducir el parto. Durante las primeras horas de nacido, al neonato se le ofrecen las siguientes alternativas: fototerapia simple o doble, y si las cifras de la bilirrubina continúan en ascenso, se practica la exanguinotransfusión.

La única incompatibilidad sanguínea materno-fetal que tiene profilaxis, es la causada por anti-D, y se da por medio de una inyección de gammaglobulina anti-Rho(D), dentro de las 72 horas post-parto como máximo; esto evita que la madre se sensibilice y así pueda tener futuros embarazos sin problema. Esta medida previene la sensibilización en el 90% de las mujeres susceptibles. La gammaglobulina anti-Rho(D) solo puede prevenir aquellos casos de madres no sensibilizadas, es decir, antiglobulina Indirecta negativo; puede ser administrada desde las 28 semanas de gestación en aquellas madres que se sospeche sangrado, con un refuerzo al nacimiento del niño.

Cuadro N° 3. Comparación de los cuadros hemolíticos por ABO y Rh		
Sistema sanguíneo	Sistema ABO	Sistema Rho(D)
Frecuencia	Más frecuente.	Menos frecuente.
Agresividad	Menos grave.	Más grave.
Hallazgos hematológicos	Anemia leve, reticulocitos normales. Esferocitos.	Anemia, eritroblastos, esquizocitos, reticulocitos > 5%, punteado basófilo, cuerpos de Howell Jolly.
Requisitos	Madre "O", hijo "A" o "B".	Madre D negativo, hijo D positivo.
Presentación	Desde el 1 ^{er} embarazo.	Con antecedentes de embarazo o transfusión.
Tratamiento	Fototerapia. Exanguinotransfusión en casos severos.	Intrauterino. Transfusión intrauterina o inducción del parto prematuro. Posparto. Fototerapia. Exanguinotransfusión.
Complicaciones	Ictericia.	Anemia. Kernicterus. Hydrops fetalis.

Cuadro N° 3. Comparación de los cuadros hemolíticos por ABO y Rh		
Sistema sanguíneo	Sistema ABO	Sistema Rho(D)
Profilaxis	No hay.	Tratamiento a madre no sensibilizada con anticuerpos anti-Rho(D) (gammaglobulina anti-D: Rhesuman o RhoGam).

Reacciones transfusionales

Es una anemia hemolítica ocasionada por aloanticuerpos contra antígenos de algún componente sanguíneo. Hay dos tipos de reacciones hemolíticas, las intravasculares y las extravasculares.

- a) *Hemólisis intravascular*: también conocida como reacciones inmediatas, porque la fisiopatología del evento hace que los síntomas aparezcan en corto tiempo. En este caso los anticuerpos involucrados son de tipo IgM, generalmente asociados a los grupos sanguíneos ABO. La mayoría de estos eventos corresponden a errores transfusionales. Por la naturaleza del anticuerpo involucrado, desencadena una lisis intravascular y activación de complemento, lo cual se traduce en inestabilidad hemodinámica e insuficiencia renal aguda. Si el cuadro no se diagnostica pronto, el riesgo de muerte es muy elevado. El paciente que desarrolla este tipo de reacción hemolítica va a presentar hemoglobinuria
- b) *Hemólisis extravascular o tardía*: en este caso los anticuerpos involucrados son de tipo IgG y el mecanismo de hemólisis ocurre en el sistema reticuloendotelial, por lo que la anemia se instaura después de 48 horas y la afectación sistémica es más leve. El paciente va a desarrollar una anemia post transfusión y un cuadro de ictericia, y la prueba directa de antiglobulina se vuelve positiva. Estas reacciones se previenen con las pruebas pretransfusionales, donde los bancos de sangre han aumentado la sensibilidad de las pruebas, introduciendo células rastreadoras de anticuerpos que posean todos los antígenos clínicamente significativos, a saber Rh, Duffy, Kell, Kidd, MNS, Lewis, Lutheran. Sin embargo, algunos pacientes pierden los títulos de anticuerpos, por lo que dichas pruebas resultan negativas y se instaura una reacción anamnésica después de la transfusión, con elevación de los títulos en pocas horas y el inicio del cuadro hemolítico. Los anticuerpos responsables de estos cuadros son los anti-Jka, que tienden a disminuir sus títulos después de seis meses.

La clínica de las hemólisis post transfusional se puede manifestar con fiebre, disnea, dolor en el sitio de la infusión, lumbar torácico y cefalea e hipotensión en el paciente conciente. En los pacientes bajo los efectos de la anestesia, el único signo de alarma es la disminución de la presión arterial.

BIBLIOGRAFÍA

- Barros MM, Blajchman MA, Bordin JO. Warm autoimmune hemolytic anemia: recent progress in understanding the immunobiology and the treatment. *Transfus Med Rev* 2010; 24: 195-210.
- Garatty G. Immune hemolytic anemia associated with drug therapy. *Blood Rev* 2010; 24(4-5): 143-150.
- Garratty G. The James Blundell Award Lecture 2007: do we really understand immune red cell destruction? *Transfus Med* 2008; 18(6): 321-334.
- Lechner K, Jager U. How I treat autoimmune hemolytic anemias in adults. *Blood* 2010; 116(11): 1831-1838.
- Mayer B, Yürek S, Kiesewetter H, Salama A. Mixed-type autoimmune hemolytic anemia: differential diagnosis and a critical review of reported cases. *Transfusion* 2008; 48(10): 2229-2234.
- Michel M, Chanet V, Dechartres A, Morin AS, Piette JC, Cirasino L, *et al.* The spectrum of Evans syndrome in adults: new insight into the disease based on the analysis of 68 cases. *Blood* 2009; 114(15): 3167-3172.
- Packman CH. Hemolytic anemia due to warm autoantibodies: new and traditional approaches to treatment. *Clin Adv Hematol Oncol* 2008; 6(10): 739-741.
- Packman CH. Hemolytic anemia resulting from immune injury. En: Kaushansky K, Lichtman MA, Beutler E, Kipps TJ, Seligsohn U, Prchal JT. *Williams hematology*. 8 ed. China: McGraw-Hill Companies; 2010. p. 957-85.
- Segel GB, Lichtman MA. Direct antiglobulin ("Coombs") test negative autoimmune hemolytic anemia: a review. *Blood Cells Mol Dis* 2014; 52(4): 152-160.
- Swiecicki PL, Hegerova LT, Gertz MA. Cold agglutinin disease. *Blood* 2013; 122(7): 1114-1121.

LAS HEMOGLOBINAS ANORMALES

*Dr. German F. Sáenz Renauld
Dr. Walter E. Rodríguez Romero*

GENERALIDADES DE LA MOLÉCULA DE HEMOGLOBINA

La hemoglobina (Hb) es un tetrámero de aproximadamente 5,0 x 5,5 x 6,4 nm, con un peso molecular de 64.400 g/mol (64 kDa). La porción

proteica de la molécula consiste en cuatro cadenas de polipéptidos, compuestas de aminoácidos que se encuentran en un orden definido en cada cadena y cuya colocación está genéticamente determinada (Figura N° 1).

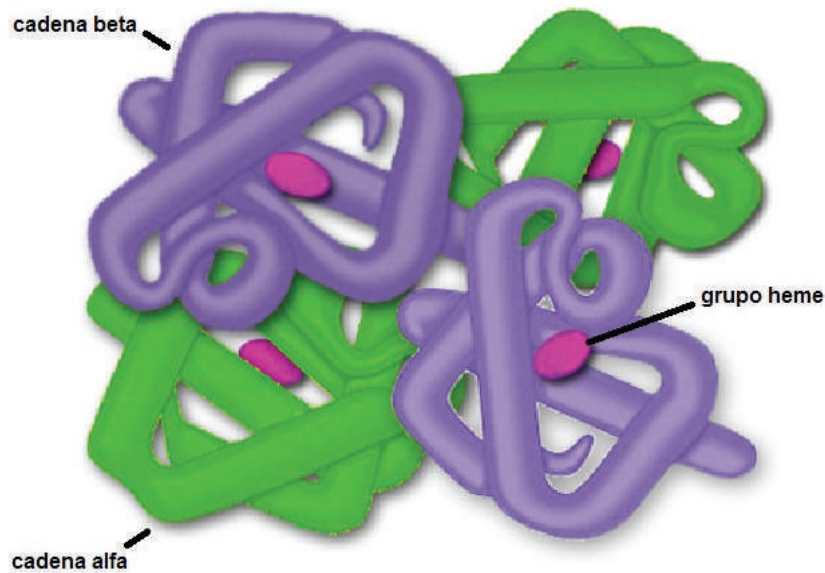


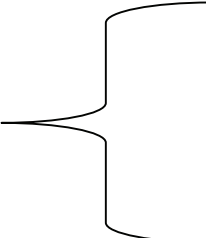
Figura N° 1. Esquema de la molécula de hemoglobina con sus respectivas cadenas.
(Modelo del Arq. Andrés Matamoros).

En los eritrocitos de adultos humanos se encuentran tres tipos de hemoglobina (Cuadro N° 1):

1. La hemoglobina A ($\alpha_2\beta_2$).
2. La hemoglobina A2 ($\alpha_2\delta_2$).
3. La hemoglobina F ($\alpha_2\gamma_2$).

En general, existen por lo menos 16 genes que gobiernan la síntesis de la globina y que originan la formación de siete cadenas de polipéptidos

estructuralmente diferentes, designados alfa, beta, gamma (dos tipos), delta, epsilon y zeta. Los genes beta, gamma y delta se hallan ligados íntimamente en el brazo corto del cromosoma 11. Los genes alfa, en prácticamente todas las poblaciones, se encuentran duplicados en el brazo corto del cromosoma 16. La heterogeneidad estructural de las cadenas gamma se explica por la presencia de más de un gene (Figura N° 2).

Cuadro N° 1. Hemoglobinas humanas normales				
Hemoglobina	Estructura	% hemolizado adulto normal	Aumentada en	Disminuida en
A	$\alpha_2\beta_2$	96	---	- Deficiencia de hierro.
A ₂	$\alpha_2\delta_2$	2,5	- Beta talasemias. - Anemia megaloblástica ($\pm$). - Hb inestable (β).	- Anemia talasemia sideroblástica. - F-talasemia. - Hb Lepore.
A1a	No conocida	<1 GlicoHb	- Diabetes mellitus.	---
A1b		<2 GlicoHb		- Anemia hemolítica.
A1c	$\alpha_2(\beta\text{-N-hexosa})_2$	<5 GlicoHb	---	---
F*	$\alpha_2\gamma_2$ (136 ^{Gli o alan})		- Glóbulos rojos fetales. - β -talasemia. - Anemia drepanocítica. - Anemia perniciosa. - PHHbF, F-tal, etc.	---
Gower 1	$\zeta_2\varepsilon_2$	0	- Embrión (temprano).	---
Gower 2	$\alpha_2\varepsilon_2$	0	---	---
Portland	$\zeta_2\gamma_2$	0	---	---
H	β_4	0	- α /-- --talasemia.	---
Bart	γ_4	0	- Eritroleucemia y SMD.	---

* Niveles de HbF después del año: menos de 2%.

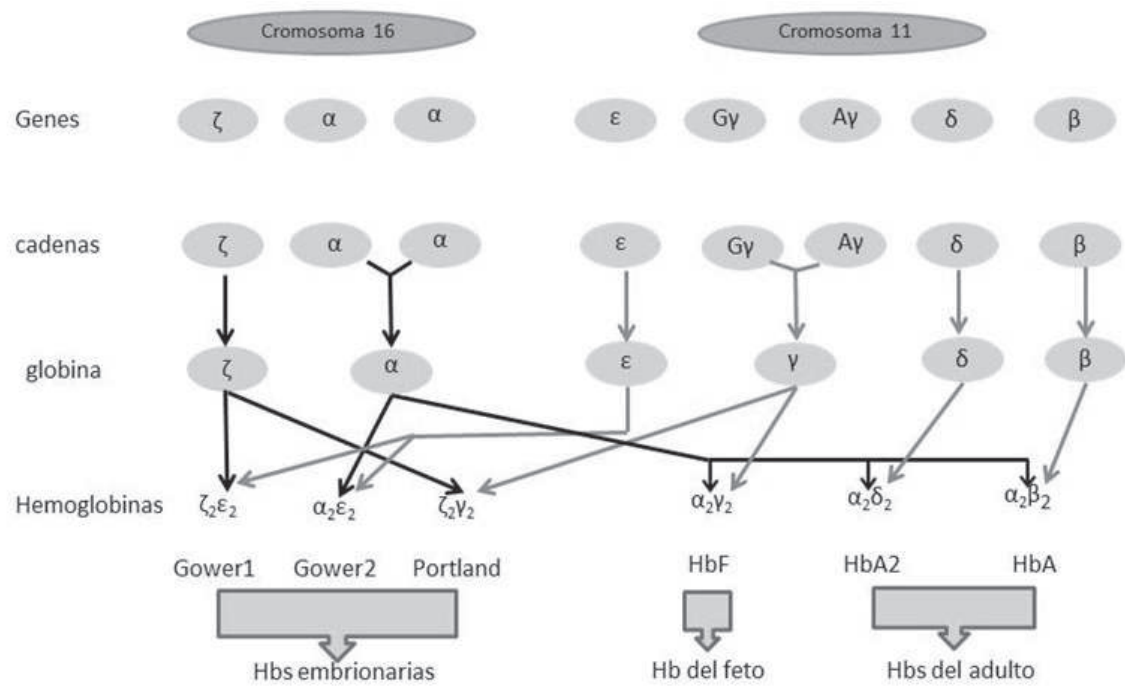


Figura N° 2. Genes, cadenas de globina y hemoglobinas humanas.

El grupo heme (ferroprotoporfirina IX) se une en forma covalente a cada uno de los polipéptidos de la globina. Los residuos hidrofílicos polares cubren las superficies, mientras que los residuos hidrófobos revisten cuatro bolsas superficiales (bolsa del heme), las cuales contienen un grupo heme con su hierro situado entre dos radicales de histidina. La histidina proximal (58 α y 63 β) está firmemente unida al átomo ferroso, en tanto que la histidina distal (87 α y 92 β) proporciona un enlace protector y reversible para el hierro desoxigenado. Ambas histidinas están muy cerca una de otra en la profundidad de esas bolsas del heme.

La síntesis de las diversas hemoglobinas normales sufre cambios a través del desarrollo del ser humano. En un inicio se producen pequeñas cantidades de hemoglobinas embrionarias Hb Gower I ($\zeta_2\epsilon_2$), Gower 2 ($\alpha_2\epsilon_2$) y Portland ($\zeta_2\gamma_2$). Las cadenas zeta y epsilon se sintetizan más o menos a las dos semanas en el saco vitelino y en los islotes de Wolff intraembrionarios, y desaparecen en pocas semanas.

Con el inicio de la vida fetal, se sintetizan las cadenas alfa y gamma que conforman la Hb F ($\alpha_2\gamma_2$). Esta es la principal hemoproteína del feto y su producción se incrementa de manera acelerada en el período de la hemopoyesis llamado hepatoesplénico. Unas semanas antes del nacimiento empieza a disminuir notablemente su producción, tendencia que se va a mantener hasta el año de edad, cuando se normaliza su valor en

menos de 2%. Al nacimiento la Hb F se halla entre un 60% y un 80% del total de la Hb. Ya entre los 8 y los 12 meses ha disminuido a menos de un 3% (Cuadro N° 2).

Además, la Hb F se encuentra anormalmente elevada en algunas anemias que se desarrollan a temprana edad, como sucede con diversas hemoglobinopatías, en ciertas anemias crónicas y en neoplasias hematopoyéticas.

Cuadro N° 2. Valores de la Hb fetal luego del nacimiento	
Edad	% de la Hb F
Nacimiento	70-90
1 mes	50-75
2 meses	25-60
3 meses	10-35
4 meses	5-20
6 meses	8
9 meses	5
1 año	2
adulto	1

ORGANIZACIÓN INTRAERITROCÍTICA DE LA MOLÉCULA Hb

Las principales funciones de la Hb son:

1. Unión con el oxígeno o afinidad por el oxígeno.
2. Cooperatividad o interacción heme-Bohr.
3. Fijación de iones de H⁺ o efecto Bohr.
4. Fijación de CO₂ o formación de carbamidas.
5. Fijación del 2,3-DPG.

Se ha calculado que en una concentración hemoglobínica intracelular de 34 g/dl, los tetrámeros están separados solo por 1 µm. Es evidente que a pesar de un empaquetamiento tan estrecho, las moléculas se encuentran libres para rotar. La estructura de estos tetrámeros globulares, que poseen fundamentalmente residuos polares en la superficie y residuos no polares en el interior de la molécula, explican la alta solubilidad de la Hb normal en medios acuosos. No obstante, esas pequeñas distancias intermoleculares, ámbitos cortos de fuerzas de interacción entre los residuos de la superficie y las cadenas contiguas, pueden ser de gran importancia en el mantenimiento del estado físico normal de la Hb intracelular.

Los diferentes cambios de aminoácidos en el interior de la molécula a menudo alteran la estructura y función de la Hb, llevándola a una inestabilidad o a una afinidad alterada por el O₂, aun en heterocigotos. Tales alteraciones pueden tener consecuencias clínicas serias. Por el contrario, cuando las sustituciones ocurren en la superficie de la molécula, usualmente no tienen efectos importantes en su función y estabilidad, por lo que los heterocigotos no suelen mostrar anomalías clínicas. Algunas de estas sustituciones en la superficie, mientras no alteren la conformación general, ni las relaciones intertetrámeros o la interacción de las subunidades dentro de los tetrámeros, son inocuas. No obstante, ciertas mutaciones pueden alterar las interacciones intermoleculares y expresar manifestaciones clínicas importantes, como en el caso de las Hbs S y C. En la Hb S, la sustitución de la valina por el residuo normal glutamato en la posición 6 (A3) de la cadena beta, da como resultado una polimerización de la deoxi Hb y falciformación ("sickleemia") de los eritrocitos. En la Hb C la sustitución en el mismo punto, esta vez por lisina, baja la solubilidad de la Hb y promueve su cristalización dentro de las células. Por fortuna, estos efectos tienen repercusión clínica significativa solo cuando predominan los tetrámeros mutantes, como sucede en los homocigotos o en dobles heterocigotos.

Las alteraciones de la estructura primaria de la molécula de la Hb pueden afectar cualquiera de las cadenas polipeptídicas. En consecuencia, la función de la Hb anormal va a depender no solo del tipo de cadena afec-

tada, sino también de la parte en la cadena en que esa alteración se ha efectuado y, muy importante, del aminoácido sustituido. De tal suerte, la sustitución de un aminoácido hidrofóbico por un aminoácido polar (mutación frecuente), modifica la estabilidad, la cohesión y la solubilidad de la molécula. Por otra parte, la sustitución de un aminoácido cualquiera por una prolina (imino-ácido) produce una interrupción de la hélice con modificación de la estructura secundaria y, tal vez, de la terciaria. Finalmente, el cambio de un aminoácido de volumen pequeño por otro de gran volumen modifica las relaciones entre diferentes puntos de la molécula.

Estas alteraciones en diversas partes de la globina dan lugar a las hemoglobinopatías, siendo las más usuales los cambios puntuales. Hasta febrero de 2014, el *Database of Human Hemoglobin Variants and Thalassemia* reporta 1182 variantes, la mayoría inocuas o producto de cambios de aminoácidos de carga similar, lo que dificulta su detección.

BASES GENÉTICAS Y MOLECULARES DE LAS VARIANTES DE LA Hb

Como se mencionó, tanto las cadenas de globina alfa como las no alfa son el producto de la actividad de genes separados, unos codificados en el cromosoma 11 y otros en el 16. Por lo tanto, una Hb mutante comprende una anomalía estructural de una subunidad específica de globina. Las variantes de Hb se heredan como rasgos codominantes de acuerdo con el modelo clásico de Mendel.

Si se toma como base la herencia de la Hb S, tan frecuente en nuestro medio, se pueden analizar diversas combinaciones. Por ejemplo, si ambos padres son portadores de Hbs, es decir, son AS, es esperable que la mitad de la descendencia sea normal (AA) y un 25% homocigota (SS). Por otra parte, si uno de los padres posee el fenotipo AS, el 25% de la descendencia puede ser normal AA, un 25% AC, 25% AS y el 25% remanente doble heterocigota (SC). Para comprender mejor es necesario notar que normalmente se poseen dos genes β (β^Aβ^A), mientras que una heterocigota para HbS (HbAS) sería β^Aβ^S.

TIPOS DE MUTACIONES EN Hbs ANORMALES

Mutación puntual o sustitución de una simple base

De las más de 1100 variantes de Hb descritas, la gran mayoría son producto de este tipo de mutación, la cual es el resultado del cambio de una sola base (Cuadro N° 3). Las dos sustituciones clásicas en la posición 6 de la cadena Beta, Glu-val en Hbs y Glu-lis en la HbC, son ejemplos típicos de este tipo de mutación (Figura N° 3).

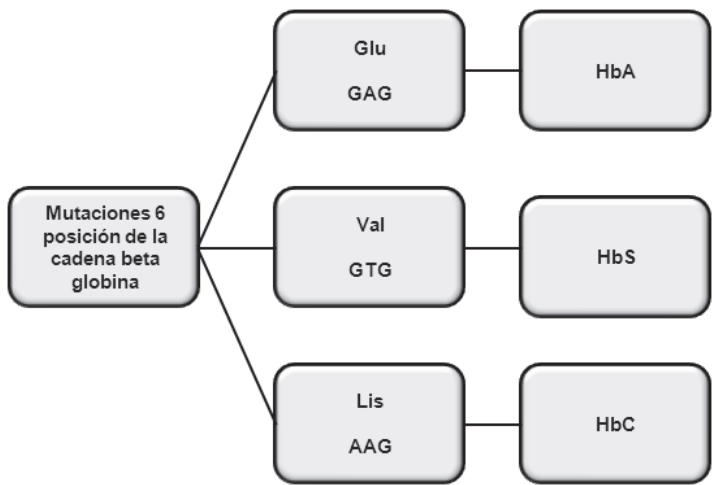


Figura N° 3. Mutaciones proteicas y a nivel de ADN en la sexta posición de la cadena de globina β en las Hbs anormales más frecuentes en el Caribe.

Cuadro N° 3. Bases moleculares de algunas de las variantes de la hemoglobina humana		
Mecanismo básico	Cadenas	Ejemplos
a) Sustitución (es) de aminoácidos en la cadena (por sustitución (es) en el codón de una base (s)). 1. Una sustitución (ej: GUA de valina, HbS). 2. Dos sustituciones (18*).	β α δ δ β β	S(6 glu-val),C, D, E, New York (339*) I. Cubujuquí, M. Boston (203*) F. Texas I, F Hull (62*) A2 Sphakiá, A2 Flatbush (18*) C Harlem (6 glu-val; 73 asp-Asn) J Singapore
b) Pérdida de aminoácidos (22*) (con pérdida de un correspondiente codón (es) o por entrecruzamiento no homólogo).	β β β β β β	Freiburg (1)** (23 val----- 0) Gun-Hill (5) Leiden (1) Niteroi (3) (43-45 fenilala-glu ser-----0) Tochigi (4) St. Antoine (2)
c) Hemoglobina por fusión (10*) (con entrecruzamiento no homólogo entre genes que codifican para dos diferentes subunidades).	δβ βδ δβ	Hbs Lepore (NH ₂ -δ-COOH) Miyada (anti-Lepore NH ₂ -δCOOH) Kenya

Cuadro N° 3. Bases moleculares de algunas de las variantes de la hemoglobina humana		
Mecanismo básico	Cadenas	Ejemplos
d) <u>Subunidades elongadas</u> (13*)		
1. Sustitución de una base en codón terminal.	α	Constant Spring (31 aa. adicionales)
	α	Icaria
	α	Koya Dora
	α	Wayne (repetición de 7aa)
2. Con desviación en el marco.	β	Tak

* Número de variantes conocidas (2014: N: 1182).

** Número de aminoácidos perdidos.

Unas pocas variantes de la Hb A tienen sustituciones en dos sitios diferentes de una misma subunidad. Por ejemplo, la Hb C Harlem (beta o Glu-val; 73 asp-asn), la Hb C Zinguinchor (beta o Glu-val; 58 pro-arg), la Hb J Singapore (alfa 78 asn-asp; 79 ala-gli), la Hb S-Travis (beta o Glu-val; 142 ala-val), entre otras.

Mutaciones por errores terminales (subunidades elongadas)

También ocurren Hbs anormales en las que una cadena en particular es anormalmente larga. La Hb Constant Spring (CS) es una variante que presenta de 28 a 31 aminoácidos extras en la cadena alfa. En este caso, la adición de más aminoácidos puede deberse a un cambio de una base en el codón normal terminal (UAA o UAG), que produce otro nuevo que codifica a glutamina (CAA o CAG), como el primer aminoácido extra. La HbCS tiene la particularidad de baja síntesis, por lo que se le incluye como un fenotipo de alfa talasemia menor silenciosa. Es una Hb frecuente en aquellas zonas geográficas en las cuales hay prevalencia de talasemia alfa.

Mutaciones con desviación en el marco (tipo Frame-Shift) (subunidades alargadas)

La Hb Wayne es una Hb inocua que posee cadenas alfa anormalmente largas, producto de una desviación en el marco de lectura del ácido ribonucleico (ARN). Contiene una secuencia normal de aminoácidos hasta la posición α 138. Luego aparece una secuencia totalmente nueva de ocho aminoácidos.

Mutaciones con pérdida de residuos (subunidades acortadas)

Unas pocas Hbs anormales son el resultado de la

pérdida de uno o más aminoácidos en una cadena anormal. Probablemente, estas cadenas comprenden pérdida de uno o más codones intactos (del ARNm). Por lo general, estas variantes son inestables y se asocian con anemia hemolítica con cuerpos de Heinz. Algunos ejemplos son: Hb Leiden (a 6 o 7 glu O) y Hb Niterol (a (42-44 o 44-45) O).

Mutaciones por entrecruzamiento meiótico desigual (fusión de subunidades)

Las llamadas Hbs Lepore fueron las primeras Hbs en las que se demostró la existencia de cadenas híbridas o de fusión tipo delta-beta (NH₂-delta/beta-COOH). Estas variantes consisten de una porción de la parte N-terminal de la cadena delta (50 a 80 aminoácidos), unida a una porción C-terminal de las cadenas beta (60 a 90 aminoácidos); la nueva cadena contiene 146 aminoácidos, como es el número en la cadena beta normal.

Las Hbs Lepore han surgido a través de un entrecruzamiento no homólogo desigual, entre parte del locus delta de un cromosoma y parte del locus beta del cromosoma complementario, durante el proceso de la meiosis. Como resultado, se producen dos cromosomas anormales. El primero, el cromosoma Lepore, no posee loci intactos beta y delta, pero contiene el gene Lepore o delta-beta, el cual, por otra parte, no dirige una síntesis normal de cadenas delta-beta; por esto, se comporta como un fenotipo de beta talasemia menor en el paciente heterocigoto y de beta talasemia mayor moderada en el Lepore homocigoto.

Finalmente, cabe el ejemplo excepcional de la Hb Costa Rica (B77 his-arg), originada por mutación somática. La base genética de esta única variante inocua produce una distribución desigual en la población eritrocítica, a

manera de su mosaiquismo. Obviamente su trastorno genético solo se encontró en el ARN.

A continuación, se detallan en el Cuadro N° 4 las variantes descritas hasta el año 2014, según cada tipo de defecto.

Cuadro N° 4. Variantes de Hb según tipo de mutación*	
Tipo de mutación	Número de variantes
Mutaciones en gene globina ($\alpha 1$)	326
Mutaciones en gene globina ($\alpha 2$)	398
Mutaciones en gene globina β	833
Mutaciones en gene globina δ	110
Mutaciones en gene globina γA	58
Mutaciones en gene globina γG	72
Mutaciones por genes de fusión	9
Mutaciones por sustitución	1293
Mutaciones por inserción	67
Delecciones	204
Alta afinidad por oxígeno	94
Hemoglobinas inestables	146
Metahemoglobinas	9
Total de variantes	1182

* Algunas hemoglobinas entran en varias categorías.

Fuente: *Database of Human Hemoglobin Variants and Thalassemia*.

ESTUDIO DE LAS HEMOGLOBINAS ANORMALES

El estudio de las variantes estructurales de la Hb se describe con detalle en los respectivos capítulos de laboratorio. El método comúnmente usado es la electroforesis de Hb en diferentes medios. Esta metodología tiene el inconveniente de que no discrimina cuando hay sustituciones neutras y se recomienda usarla al menos con distintos sistemas de pH. Otras técnicas importantes que se han utilizado o que se emplean en la actualidad son: análisis con rayos X, por cristalografía, inmunoquímica, estudios cualitativos y cuantitativos de estructura proteica, estudio de la composición y distribución de aminoácidos, cromatografías, isoelectroenfoque, HPLC, electroforesis capilar, espectrometría de masas, reacción en cadena de la polimerasa y secuenciación de ADN. No existe una metodología única. Los expertos recomiendan, al menos, el uso de dos técnicas distintas que detecten características bioquímicas modificadas de la Hb.

El estudio de las hemoglobinas anormales se inicia con el fraccionamiento electroforético de Hb, por Pauling, quien en 1949 identifica la Hb S, asociada con el fenómeno de drepanocitosis. El conocimiento de este hecho revolucionó la medicina, pues en un principio fue sorprendente el aceptar que un simple cambio de un aminoácido por otro en una de las cadenas de globina, fuese la diferencia entre salud y enfermedad y, en ocasiones, enfermedad mortal.

Después del hallazgo de Pauling *et al*, fueron descubiertos otros tipos de Hbs anormales, desde que se confirmó que su presencia podía ser detectada por electroforesis, haciendo posible para muchos laboratorios de hematología la búsqueda de nuevas hemoglobinas. En el Cuadro N° 5 se indica una agrupación de las más frecuentes Hbs de acuerdo con su migración lenta, rápida o como Hb A en la electroforesis convencional.

Cuadro N° 5. Clasificación de las hemoglobinas con base en las características de migración electroforética a pH 8,6		
Grupo	Movilidad hacia el ánodo	Tipos de Hb
I (Grupo C)	más lentas que S	(C, O, A2, E) y variantes como Gower I, Gower II, Alexandra, etc.
II (Grupo S)	igual a S	S, D, Lepore, Korle-Bu, G-Philadelphia, etc.
III (Grupo G)	entre S y A	L, P, G, Q, F, Zurich, etc.
IV (Grupo A)	igual a A	A, M, (todas las "silenciosas").
V (Grupo J)	entre A y H	K, J, N, Norfolk, Bart, Cubujuquí, Suresnes, New York.
VI (Grupo H)	igual a H	H, I.

Las variantes de Hbs anormales fueron originalmente referidas a las letras del alfabeto y el orden alfabético se aplicó de acuerdo con el momento en que fueron descubiertas: A, C, D, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P y Q. Las letras B y V se omitieron para evitar confusión con la "hemoglobina B", el viejo término para la Hb S. Otras hemoglobinas descritas se han denominado por la región donde fueron halladas (Boston, Norfolk, Saskatoon, Leipzig, Stanleyville, Bart, Lepore, Cubujuquí, Costa Rica, Zurich, etc.). Es importante indicar que la gran mayoría de las hemoglobinas Hbs anormales son variantes de cadenas α o β .

En las últimas décadas, la detección puntual, por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), de una mutación determinada o la secuenciación completa del gene de globina, ha permitido identificar de una forma certera diversas hemoglobinas anormales. Además, los estudios moleculares han permitido determinar las mutaciones genéticas que originan la talasemia, situación analítica de enorme valor para el diagnóstico prenatal de talasemia mayor o alfa talasemia. Otra aplicación importante es la detección de diversos haplotipos, en especial aquellos asociados a la Hb S. Estos haplotipos, que son secuencias de ADN identificados mediante enzimas de restricción, se heredan en forma mendeliana y pueden ser usados como marcadores antropológicos o asociarse, en el caso de la drepanocitosis, con la severidad clínica. Las características de estos haplotipos dependen de la población étnica que se estudie.

Hemoglobinopatías cuantitativas y cualitativas

Se refieren al tipo de trastorno que se produce en

las cadenas de globina. Las hemoglobinopatías cualitativas se caracterizan por la producción de moléculas de Hb estructuralmente anormales. En esta categoría se agrupan las hemoglobinas anormales (Hb S, Hb C, Hb E, etc.), que serían todas aquellas distintas a las tres hemoglobinas normales (Hb A, Hb F y Hb A₂).

Los defectos cuantitativos, por su parte, son conocidos como síndromes talasémicos y reflejan una producción deficiente de alguna de las cadenas de globina normales (α , β , δ y γ). Particularmente, son importantes aquellos defectos en la síntesis de la hemoglobina normal (Hb A, por ejemplo). En las talasemias hay una síntesis disminuida o ausente de una de las cadenas de globina y un aumento relativo de otras cadenas de globina, sin la aparición de una molécula de Hb que sea estructuralmente distinta.

Por ser defectos hereditarios y por razones étnicas, no es tan infrecuente que hemoglobinopatías cualitativas y cuantitativas puedan coexistir o que se cohereden dos tipos distintos de Hbs anormales. Por ejemplo, en los países de la Cuenca del Caribe se detecta la doble condición de Hb S/beta-talasemia, o la presencia de Hb SC.

En general, los estados heterocigotos (un solo gen anormal) están asociados con anomalías clínicas leves o no las tienen del todo. Los portadores de Hb inestables son heterocigotos y en algunos casos el cuadro clínico es muy severo (por ejemplo, Hb Genova). Sin embargo, el estado homocigótico o el heterocigótico doble pueden causar una enfermedad seria y a menudo fatal, aunque en otros casos

los individuos son normales. Se conocen muchos dobles heterocigotos para la Hb S y otra Hb, con una sintomatología mínima o sin ella (por ejemplo, S/Korle-Bu).

Un individuo que es heterocigoto para cadenas beta (un solo gen defectuoso) produce una hemoglobina anormal, pero también sintetiza Hb A. De hecho, la Hb A predominará bajo estas circunstancias (más del 50%). Estos heterocigotos se clasifican como que tienen el “carácter”, rasgo o son portadores de una hemoglobinopatía (como AS, AC, etc.). A los sujetos con esta condición, en el caso de las principales Hbs anormales, no se les considera “enfermos”, sino portadores.

Si se trata de cadenas beta, los homocigotos poseen un par de alelos mutantes; ellos no pueden sintetizar Hb A y esencialmente toda su Hb es anormal (por ejemplo, SS). Si hay defectos en las cadenas alfa, la proporción variará desde un 20% hasta un 50%, según el número de genes alfa implicados. Un paciente con dos variantes de cadena alfa sintetizará también Hb A, a no ser que tenga los cuatro cromosomas alterados.

Cuando se está frente a variantes de cadenas alfa, se debe considerar la presencia de cuatro genes, por lo que lo más frecuente en sujetos heterocigotos para mutantes α , es que solo tengan uno de los cuatro genes con la mutación, y por lo tanto, es frecuente que el porcentaje de estas variantes de Hb alcance niveles inferiores al 20%.

Otras hemoglobinas anormales tienen la característica de ser tetrámeros de una misma cadena de globina. Ejemplos de esto son la Hb Bart y la H, conformadas, respectivamente, de cuatro cadenas gama y cuatro cadenas beta. Como estos tetrámeros reflejan una depresión o supresión de la síntesis de cadenas alfa, se colocan dentro de las hemoglobinopatías cuantitativas (síndrome de alfa talasemia).

CLASIFICACIÓN DE LAS HEMOGLOBINAS SEGÚN SUS CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES

GRUPO I

Hemoglobinas anormales sin aberración fisiológica

Este constituye el grupo más numeroso y a pesar de que estas mutantes son de interés bioquímico, genético y antropológico, no tienen significancia clínica.

GRUPO 2

Hemoglobinas de agregación o insolubles

Las hemoglobinas S y C caben en este grupo, toda vez que los cambios estructurales que ocurren en el eritrocito son el producto de la formación de tactóides en la Hb S y de cristales en la Hb C.

GRUPO 3

Hemoglobinas producidas por síntesis desbalanceada

En este grupo se encuentran los síndromes talasémicos; en ellas un tipo de cadena de la globina es sintetizada normalmente, mientras otro no. El exceso de cadenas normales producido, precipitan como cuerpos de inclusión (Heinz).

GRUPO 4

Hemoglobinas inestables

Estas hemoglobinas, que usualmente incluyen una sustitución de aminoácido en la región en donde se efectúa la unión del heme, son susceptibles a la desnaturalización oxidativa (sulfas) con precipitación a manera de cuerpos de Heinz. En este grupo se encuentran las Hb Zürich, Köln, Seattle, Youngstown, entre más de 170 descritas. Hay que considerar como inestables los acumulos de cadenas $\alpha 4$ y $\beta 4$ que se presentan en talasemias severas.

GRUPO 5

Hemoglobinas con una función de heme anormal

Este grupo incluye nueve hemoglobinas M que se asocian con metahemoglobinas. Otras hemoglobinas, como la Chesapeake, la Cubujuquí y la Suresnes, tienen una afinidad incrementada para el oxígeno como policitemia compensatoria, mientras que la Hb Kansas y otras tienen una afinidad disminuida para el oxígeno (Cuadro N° 6).

Cuadro N° 6. Variantes de las hemoglobinas, clínicamente importantes	
I. Síndromes drepanocíticos:	
1) Rasgo drepanocítico (AS) (asintomática) 2) Enfermedades drepanocíticas (síndromes drepanocíticos mayores): a. Anemia drepanocítica pura (SS) o con alfa-tal (SS/α-tal). b. Hb SC. c. Hb SD Punjab. d. Hb SO – Arabia. e. S/beta-tal (β^0, β^+, delta-beta). f. Hb SE.	
II. Hemoglobinas inestables (anemias por cuerpos Heinz), aproximadamente 140 variantes.	
III. Hemoglobinas con alterada afinidad por el oxígeno:	
a. Alfa afinidad (policitemia). Aproximadamente 40 variantes, incluyendo dos encontradas en Costa Rica: la Hb Cubujuquí (alfa ^{14} arg-ser) y la Hb Suresnes (alfa ^{141} arg-his). b. Baja afinidad: pocas variantes, con oligocitemia. Incluye la Hb Kansas que produce además cianosis.	
IV. Hemoglobinas M: se presentan nueve variantes (todas producen cianosis).	
V. Variantes estructurales que originan fenotipos talasémicos:	
a. Hbs Lepore (fenotipo beta-tal). b. Hb Constant Spring (fenotipo alta-tal), entre otras. c. HbE.	

Variantes de Hb autóctonas o infrecuentes descritas en Costa Rica

En Costa Rica se han descrito dos variantes autóctonas de Hb. La primera fue identificada por Sáenz *et al*, y se le denominó Hb J Cubujuquí, por la zona geográfica del paciente. Esta es una mutante de cadenas alfa (α^{14} arg-ser). La otra Hb estructural reportada en este país, que tiene la particularidad de ser el primer caso descrito a nivel mundial de una mutación somática, es la Hb Costa Rica ($\alpha\beta 277(\text{EF1})\text{His}\rightarrow\text{Arg}$), descrita por Rodríguez *et al*.

El hallazgo de otras variantes de la hemoglobina, infrecuentes en el país, han sido descritas por Sáenz *et al*. Estas son: la HbE, la G Philadelphia, la Korle Bu, la New York y la Suresnes.

Por otra parte, en el laboratorio de investigación del Hospital Nacional de Niños, el Dr. Cartín reportó el hallazgo de la Hb Perth, Hb Köln, la asociación de la Hb S y la New York, una variante de la hemoglobina H, Hb Constant- Spring y la Hb Cheverly. Mientras que el Dr. Rodríguez *et al* cita la identificación de la Hb I, la Hb Raleigh y recientemente, la Hb Youngstown.

EPÍLOGO

Es notorio que en Costa Rica la frecuencia de las variantes más comunes de la hemoglobina (Hb) (S y C) puede ser trazada desde África. Estas hemoglobinas son dos marcadores genéticos que han mantenido un equilibrado polimorfismo contra la presión selectiva de la malaria en los países de origen o ancestrales. En la población caucásica son muy raras las mutantes estructurales de la Hb y se considera que nuestros indígenas no presentan ninguna alteración en el loci de la Hb. Una breve revisión antropológica, clínica, diagnóstica, genética y epidemiológica, deja claro el verdadero problema de salud pública de estas enfermedades hereditarias de la hemoglobina, con especial énfasis en la drepanocitosis. Tangencialmente, se destaca el problema de la deficiencia de la deshidrogenasa de la glucosa-6-fosfato en la etnia negra/negroide del país.

Para 1980, con la creación del CIHATA (Centro de investigación en hemoglobinas anormales y trastornos afines), en la Universidad de Costa Rica, se llevó a cabo el más ambicioso proyecto de investigación en Costa Rica, en torno a hemoglobinopatías y trastornos afines.

Para ello se seleccionó estadísticamente un muestreo de 12.000 niños escolares, diferenciándoseles en forma empírica en caucásico-caucasoide, híbridos o mestizos y de raza negra. En el Cuadro N° 7 se indica

la frecuencia de las Hbs S y C en dichas poblaciones, destacándose una alta incidencia de esas Hbs en los escolares de raza negra o de extracción africana (mestizos, híbridos).

Cuadro N° 7. Frecuencia (%) de Hbs S y C en Costa Rica Muestra en 12.000 escolares			
Fenotipo Hb	Etnia		
	Caucásica	Híbrida	Negra
AS	0,84	4,43	10,90
SS	-	0,04	0,29
AC	0,14	0,40	3,72
SC	-	0,04	0,29

Cabe destacar que no fue sino hasta 1984 cuando se pudo detectar el primer caso homocigoto de Hb C, en un niño de raza negra que ingresó al hospital por esplenomegalia y síndrome icterico.

BIBLIOGRAFÍA

- Bain B. Haemoglobinopathy diagnosis. 2 ed. Londres: Blackwell; 2006.
- Bunn HF, *et al.* Hemoglobinopathies. En: Bunn F. Major problems in internal medicine. Vol III. Philadelphia: W.B. Saunders Co.; 1977.
- Cartín W, Mora L, Valverde K, Suarez C, Jimenez R. Hemoglobin Perth in Costa Rica. *Pediatric Blood and Cancer* 2009; 53(2): 243.
- Cartín W, Suárez C, Valverde K, Valverde B, Jensen E, Abarca G, *et al.* Primer caso de hemoglobina Köln. *Acta Med Costarric* 2010; 52(1): 40-42.
- Cartín W. Investigation of low oxygen saturation and anemia in a pediatric patient from Costa Rica: Hemoglobin Cheverly. Poster. International Society for Laboratory Hematology (ISLH). Niza, Francia; 2012.
- Edward H, Du Pisani L, Rodríguez WE, Chaves J, García J, Harris NS, *et al.* Hemoglobin Youngstown [β 101(G3) Glu>Ala, HBB:c.305A>C]: An unstable variant hemoglobin causing severe hemolytic anemia. *Hemoglobin* 2014; 38(6): 381-384.
- Elizondo J, Sáenz GF, Páez C, Arroyo G. Hemoglobinopatías poco comunes en Costa Rica. *Rev Biol Trop* 1979; 27(1): 51-55.
- Kim-Shapiro D. Structure and function of hemoglobin and its dysfunction in Sickle Cell Disease. En: Steimber MH. Disorders of hemoglobin. Genetics, pathophysiology and clinical management. 2 ed. Cambridge: Cambridge University; 2009. p. 101-117.
- Mc Farlane A, Warkentin T, Cartin W. A novel sickling hemoglobinopathy. *NEJM* 2011; 365: 1548-1549.
- Pennsylvania State University. Database Hb variants and thalassemia. Globin gene server. (Versión en Internet). 2014. Consultada el 10 enero de 2014. Disponible en: <http://globin.cse.psu.edu/>
- Rodríguez WE, Castillo M, Chaves M, Sáenz G, Gu L, Wilson J, *et al.* Hb Costa Rica or $\alpha 2\beta 2$ 77 (EF1) His-Arg. The first example of a somatic cell mutation in a globin gene. *Hum Genet* 1996; 97: 829-833.
- Rodríguez WE, Villalobos J, Salas P, Hong L, Chui D. Hemoglobina Raleigh en Costa Rica detectada como un valor falsamente elevado de hemoglobina glicosilada. *Rev Biomed* 2012; 23: 33-38.
- Sáenz GF, Elizondo J, Arroyo G, Jimenez J, Montero AG. Diagnóstico de hemoglobinopatías y de trastornos afines. Enfoque poblacional del problema. *Bol of Sanit Pan* 1981; 90(2): 127-143.
- Sáenz GF, Elizondo J, Arroyo G, Valenciano E, Rojas LF, Jiménez J, *et al.* Hemoglobinopatías en 12.000 escolares costarricenses. *Acta Med Costarric* 1980; 23: 89-99.
- Sáenz GF, Cháves M, Rodríguez WE, Sánchez G, Barrantes A, Barrenechea M, *et al.* Frecuencia de beta talasemia y otras hemoglobinopatías en población costarricense de raza negra. *Rev Cost Cienc Med* 1990; 11(1): 3-11.
- Sáenz GF. Hemoglobinas anormales. *Acta Med Costarric* 2005; 47(4): 173-179.
- Sáenz GF, Rodríguez WE. Las hemoglobinas anormales. En: Sáenz GF. *Hematología Analítica*. 5 ed. San José: EDNASSS; 2008. p. 196-203.

SÍNDROMES DREPANOCÍTICOS Y OTRAS HEMOGLOBINOPATÍAS

Dr. German F. Sáenz Renauld
Dr. Walter Rodríguez Romero
Dr. Miguel A. Rodríguez Pineda

SÍNDROMES DREPANOCÍTICOS

Se designa como síndromes drepanocíticos a los fenotipos hemoglobínicos en los que existe HbS ($\alpha_2\beta_2$ 6 glu-val) en doble dosis (anemia drepanocítica, HbSS), en forma heterocigota con la HbA (fenotipo común o rasgo AS), con otra Hb anormal (SC, SE, SG, etc.), con genes de β -tal (S/ β^0 -tal, S/ β -tal, S/ $\delta\beta$ -tal, etc.), con genes de α -tal (AS/ α^{++} -tal, AS/ α^0 -tal, SS/ α^{++} -tal, SS/ α^0 -tal, etc.) o con la persistencia hereditaria de la HbF (S/PHHbF), sea de la modalidad homogénea o heterogénea.

Anemia drepanocítica

La anemia drepanocítica (AD), también conocida como anemia falciforme o drepanocitosis, es una enfermedad crónica. Esta y la talasemia mayor constituyen las dos formas más comunes en el mundo de enfermedad hereditaria. Por lo general, la AD provoca un estado de hemólisis crónica de tipo severo. Sus signos y síntomas la convierten en un trastorno hereditario homocigoto de permanente morbilidad y alta mortalidad, en especial en los primeros años de vida. Su curso se caracteriza por complicaciones médicas mayores esporádicas e inesperadas, que generan mortalidad y morbilidad importantes. Se tienen muchos conocimientos acerca de la enfermedad a nivel molecular; sin embargo, los conocimientos clínicos distan de ser completos. En Estados Unidos y en Costa Rica la AD se observa sobre todo en sujetos de raza negra y en nuestro caso, también en personas de extracción africana (mestizos) y en sujetos que fenotípicamente se ven caucásicos-caucasoides, como sucede en Arabia, Irán, el Sur de Italia y Grecia y ciertas zonas de la India.

Estos trastornos se aprecian con frecuencia máxima en regiones geográficas donde el paludismo es endémico. Esta relación resulta del efecto protector del rasgo drepanocítico (AS) contra el *Plasmodium falciparum*. Una vez que el parásito infecta el eritrocito que contiene HbS (HbAS), la célula se torna falciforme y es secuestrada rápidamente y destruida junto con el parásito en el sistema mononuclear fagocítico.

Cabe destacar que la malaria *falciparum* en el paciente homocigótico (HbSS) es muy severa, y en África constituye la principal causa de muerte, especialmente en niños; mientras que en el Caribe es la neumococcemia y otras septicemias bacterianas, a menudo asociadas con el síndrome de secuestación esplénica.

Origen de la mutación de la HbS (β^S)

Estudios antropológicos asociados a análisis biomoleculares sugieren que el gen de la globina β^S es el resultado de un proceso de mutación de bases nitrogenadas que ocurrió hace 50 a 100 mil años, en los periodos paleolítico y mesolítico. Estos mismos estudios señalan a África como el lugar probable en el que ocurrió dicha mutación, lo cual coincide con la presencia del *Homo sapiens sapiens* (hace 40 mil años) y el *neanderthalis* (hace 100 mil años), nuestros antepasados más directos. La causa que motivó ese cambio de una base nitrogenada (adenina) por otra (timina), cuya traducción molecular provoca la sustitución del ácido glutámico por valina en la posición número 6 de la globina β , es un asunto todavía desconocido.

Con la introducción de técnicas de biología molecular y, particularmente, con el estudio de los haplotipos de HbS (con el uso de enzimas de restricción), se dio un nuevo impulso al estudio de la HbS, lo que permitió confirmar que esta tenía múltiples orígenes. Estos análisis del gen β^S han demostrado que existen al menos cinco tipos de HbS, es decir, de drepanocitosis: SS-Benín, SS-Bantú, SS-Senegal, SS-Camerún y SS-árabe-indio, todas con la misma mutación, pero con diferente extensión en las lesiones moleculares ocurridas a lo largo del agrupamiento de los genes de globina del cromosoma 11 (5'- ϵ , γ^G , γ^A , $\Psi\beta$, δ y β^S -3'). Estos descubrimientos esclarecieron en parte la diversidad clínica que se observa en diferentes pacientes con AD, algunos con una evolución clínica benigna y otros con constantes complicaciones. Asimismo, lograron establecer el origen multicéntrico del gen de la HbS, dejando atrás el antiguo concepto de una causa unicéntrica.

Fisiopatología

La presencia de una valina anormal (β^6 val) provoca una alteración local en la superficie de la molécula, la cual en condiciones de desoxigenación se hace insoluble y polimeriza. A fin de cuentas, los millones de millones de moléculas de HbS se arreglan en fibras y luego en tactoides (polimerización), que en conjunto dan la imagen microscópica del drepanocito irreversible, el cual constituye un poiquilocito con las siguientes características promedio: VCM: 75 fl; CHCM 45% y P_{50} γ . Estas células se forman en el plazo de 24 horas, luego de la etapa de reticulocito; se encuentran tanto en sangre arterial como venosa; tienen 2,3 DPG normal y HbF $\downarrow$; presentan una aumentada adherencia endotelial y una reología anormal y su número está en relación directa con el grado de hemólisis. En la drepanocitosis, los reticulocitos tienen una gran adherencia endotelial, y en unión de otras células densas y del propio eritrocito falciforme, son los mayormente responsables de la vaso-oclusión, la isquemia y las crisis de dolor, propias de la enfermedad.

Aunque la herencia de la hemoglobina S es autosómica recesiva, para el rasgo AS la falciformación de los eritrocitos es dominante en condiciones de baja tensión de oxígeno. En la condición homocigota (HbSS) y en ciertos fenotipos drepanocíticos (HbS/C; S/ β -tal), estos cambios se pueden producir a niveles fisiológicos de la tensión de oxígeno venoso. De esa forma, habrá hemólisis crónica y baja sobrevivencia de los glóbulos rojos (12-25 días), así como fenómenos vaso-oclusivos. Altos niveles de HbF protegen del

fenómeno de polimerización (llamado también sickle cell anemia- o falciformación). Asimismo, la hipocromía que se produce por la coherencia de genes de β y α -tal, al disminuir el volumen de la hemoglobina celular ($\downarrow$ CHCM), aminora la tendencia sicklélica, por lo que la clínica tiende a ser menos severa en estos fenotipos.

Las consecuencias fisiopatológicas de la AD son secundarias a las complicaciones repetitivas de oclusión vascular en la anemia hemolítica crónica y a una aumentada adhesión capilar. La rigidez y la fragilidad de los drepanocitos explican estas dos complicaciones. Dentro del aparato circulatorio los eritrocitos normales con diámetro de 8 μ deben atravesar orificios con diámetro muy pequeño, incluso de 2 μ ; sin embargo, los drepanocitos, en cualquier estado evolutivo, son incapaces de hacer eso, por lo que van siendo atrapados. Ello produce estasis circulatoria e hipoxia, aumentando la deformación semilunar. La deshidratación y la hipertonicidad también incrementan la tendencia del eritrocito a la deformación drepanocítica y a la formación de células densas. La oclusión extensa produce necrosis tisular y las llamadas crisis dolorosas o eventos vaso-oclusivos, que son las principales causas de todos los síntomas de esta enfermedad. La deshidratación de las células falciformes, la formación de células densas y de los propios drepanocitos inducen la hemólisis y promueven la adhesión endotelial (Figura N° 1). Por eso, la homeostasis de cationes resulta muy importante en el tratamiento de esta enfermedad.

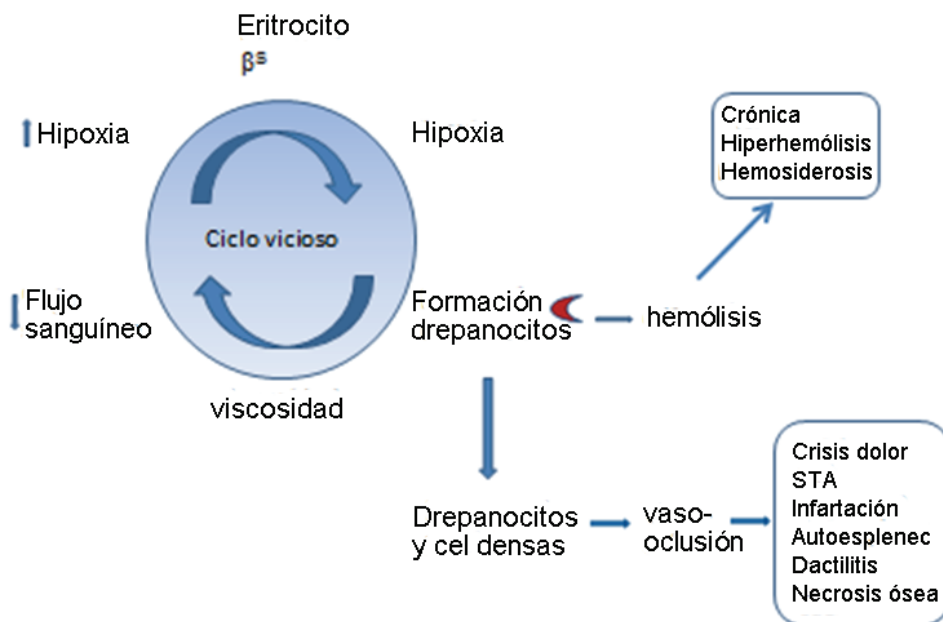
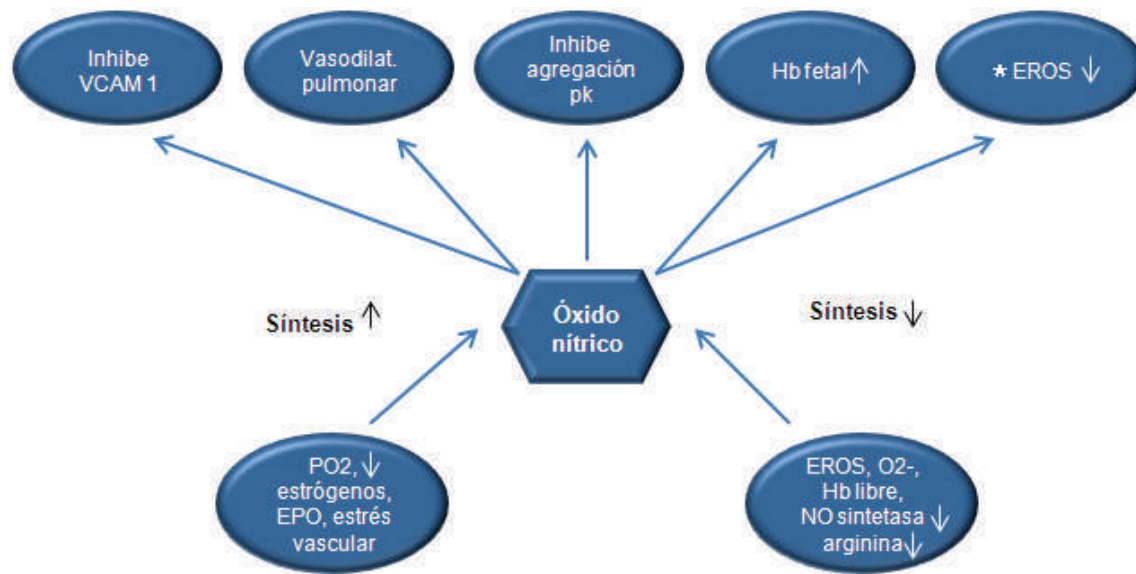


Figura N° 1. Ciclo de la drepanocitosis, hemólisis y trombosis.

Es importante mencionar que en el proceso hemolítico intervienen el fenómeno de opsonización que promueve la eritrofagocitosis, la fragilidad mecánica y el daño oxidativo, además de la formación del drepanocito irreversible (DI) con su membrana rígida (hemólisis extravascular).

En cuanto al proceso trombótico en esta patología, gracias a las investigaciones, cada vez se entiende mejor su complejidad. De tal forma, además de la participación de las células densas, se ha involucrado una serie de receptores celulares de adhesión, que contribuyen al proceso de adhesión y de trombosis.

Se ha comprobado, además, la importancia protectora del óxido nítrico (NO), que sintetizado normalmente en la pared vascular favorece la vasodilatación. En la drepanocitosis hay inhibición en la síntesis de esta sustancia, asociada a la producción de especies reactivas de O_2 por medio de macrófagos activados por aumento de citoquinas. La deficiencia de arginina también afecta la producción de NO; este déficit se produce cuando los eritrocitos destruidos liberan la enzima L- arginasa, que destruye la arginina, la cual es sustrato para la síntesis del NO. La hemoglobina libre, el heme y el hierro también favorecen el estado oclusivo, al inhibir esta sustancia (Figura N° 2).



* EROS: especies reactivas de oxígeno.

Figura 2. Rol del óxido nítrico en la fisiopatología de la drepanocitosis.

El rol de los macrófagos en la fisiopatología de la enfermedad, se comprende mejor al haber una externalización de la fosfatidil serina que activa los macrófagos con producción de radicales libres. En estas células se incrementa la actividad de la xantina oxidasa, que acelera la producción de anión superóxido; que a su vez inactiva el NO y, por lo tanto, favorece la vasoconstricción y la trombosis.

La disminución del NO afecta la agregación y la adhesión plaquetaria, además de disminuir su efecto vasodilatador, estableciendo un estado pretrombótico.

Aspectos clínicos y de tratamiento

Mediante modelos experimentales en ratones *sickle-micos* transgénicos, se ha logrado también la corrección de la AD con terapia génica. El único tratamiento curativo es el trasplante de progenitores hematopoyé-

ticos (células madre). El desarrollo de técnicas como el trasplante no ablativo con células de cordón (y de médula ósea) y de donantes no relacionados pero de igual etnia, es un hecho comprobado y prometedor. La esperada terapia génica, bastante adelantada en ratones transgénicos (drepanocíticos), es probable que se pueda obtener en algunos años.

Por otra parte, se ha comprobado el efecto antipoli-merizante de la Hb fetal, que además tiene una afinidad aumentada por el oxígeno. Dicha propiedad se ha visualizado en las menores manifestaciones clínicas de sujetos homocigotos que expresan altos niveles de esta Hb, en comparación con los que poseen bajos valores. Esta observación se ha utilizado para el tratamiento clínico. El uso de la hidroxurea ha mejorado de forma notoria la sobrevida de sujetos con la enfermedad, al inducir una síntesis sostenida de la Hb fetal.

En cuanto a los aspectos clínicos, cabe destacar que en la drepanocitosis usualmente no se producen síntomas en los primeros seis meses de vida, debido a que por ese tiempo la Hb predominante es la HbF. Luego de ese período, el niño se presenta con palidez e ictericia producto de la anemia hemolítica crónica asociada a la enfermedad. El agrandamiento del bazo y del hígado es característico de la etapa infantil, y se da como resultado de la hemopoyesis extramedular o por la congestión secundaria por la *sicklemia* intravascular. Después de un año de edad, el bazo no suele ser palpable en niños con AD, a diferencia de la esplenomegalia persistente advertida en pacientes con HbS y β -tal, o con HbS y HbC (HbSC) o HbCC y HbC β -tal. A partir de la adolescencia, lo usual es que ocurra infartación de bazo (autoesplenectomía), provocado por infartos esplénicos.

Por mucho, el fenómeno vaso-oclusivo es el principal responsable de la morbilidad y mortalidad de la drepanocitosis. Las crisis vaso-oclusivas son ataques muy dolorosos y pasajeros que resultan de daño isquémico de los tejidos. Pueden durar unos días, aunque en ocasiones persisten por semanas. Pueden ser desencadenados por infección, fiebre, acidosis, deshidratación o sin causa aparente. La trombosis afecta diversos tejidos, dañándolos en forma irreversible, y dependiendo del sitio de isquemia así será el daño tisular. El proceso trombótico a nivel de la microvasculatura resulta de gran importancia. Entre las consecuencias clínicas de la vaso-oclusión se presenta: necrosis de cabeza de fémur, dactilitis, ulceraciones en las extremidades inferiores (maléolos), priapismo, síndrome torácico agudo, retinopatía, nefropatía y otros, como el desencadenamiento de las llamadas crisis de dolor.

Además de lo mencionado, se pueden presentar otras formas críticas en esta enfermedad, como son las crisis aplásticas, hiperhemolíticas y de secuestro esplénico. Estas últimas constituyen el cuadro clínico más peligroso de la AD durante la niñez.

Otra complicación es la predisposición a infecciones bacterianas con alto índice de mortalidad, debido a que se comportan como pacientes autoesplenectomizados y con mayor susceptibilidad a bacterias capsuladas como *Haemophilus influenzae* y *Pneumococcus*, a osteomielitis por *Salmonella* y *Staphylococcus aureus*, y sepsis por *Escherichia coli*, iniciada por infección del tracto urinario.

En niños puede haber retardo en el crecimiento y en el desarrollo de las características sexuales secundarias. Con el tiempo cualquier órgano del cuerpo puede verse afectado por episodios recurrentes oclusivos, que son los cuadros clásicos de esta enfermedad.

Se debe reiterar que la anemia drepanocítica (AD) es una enfermedad monogénica compleja, por lo que es poco probable que un solo procedimiento de tratamiento pueda controlar o mejorar todas las manifestaciones clínicas. Recientes investigaciones en ratones transgénicos "drepanocíticos" han permitido esperar valiosos datos sobre la fisiopatología de la AD y su tratamiento, extrapolando los resultados en ratones a los seres humanos.

La generación polimerizadora de la HbS es la máxima expresión del evento monogénico, con sus consecuencias intracelulares. Sin embargo, también participan otros genes no ligados directamente con el gene β^S , llamados pleotrópicos o efectores secundarios. El conocimiento de estos genes podría ayudar a definir el riesgo de cada paciente o la propia severidad de la AD, ya que no todos los enfermos tienen genes pleotrópicos iguales; por tanto, antes de que esté disponible la terapia génica y no se utilice el trasplante de células madre, se debe hacer uso de una poliquimioterapia. Los principales genes efectores o epistáticos que se han podido determinar son: la coherencia de α -talasemia, que mejora el fenotipo al disminuir la CHCM; la mutación .158C→T en el gen gamma (G^γ), que aumenta la expresión de la HbF (como en el caso de los haplotipos Senegalés y Árabe-Indio), y la población femenina en la cual aún se desconocen los genes epistáticos que mejoran el fenotipo. Por lo tanto, la AD es fenotípicamente una enfermedad multigénica.

Algunos pacientes con AD presentan una enfermedad ligera o moderada y sobreviven a la edad adulta sin mayores complicaciones. Los factores responsables para esta heterogeneidad clínica han sido objeto de muchos estudios. Como ya se mencionó, se ha comprobado el efecto favorable del incremento de la HbF, la presencia de haplotipos protectores que elevan la HbF, la coexistencia de α -tal y algunos factores ambientales. En lo particular, se ha constatado que pacientes con AD que presentan altos niveles de HbF usualmente tienen un curso clínico moderado; esto considerando que al no copolimerizar la HbF con la HbS, se inhibe en gran medida el fenómeno *sicklémico*. En términos generales, los pacientes con HbS y HbC (HbSC) y con HbS y gen de β -tal, o de α -tal, tienen curso clínico más benigno.

En la actualidad se da hidroxiurea a los pacientes con síndromes drepanocíticos mayores, para aminorar los síntomas, gracias al efecto benéfico de la elevación de la HbF (Cuadro N° 1); en pacientes politrasfundidos se utilizan los quelantes de hierro.

Cuadro N° 1. Efectos de la hidroxiurea		
Médula ósea	Sangre periférica	Vasos capilares
- Reducción de celularidad. - Aumento de proporción de eritroblastos productores de HbF.	- Aumento de HbF. - Macrocitosis. - Mejor hidratación. - Reducción de DI, reticulocitos y granulocitos.	- Reducción de la adherencia endotelial. - Mejoría de la función endotelial.

Es importante señalar que el sujeto portador (AS) es usualmente asintomático. Hay algunos reportes de daño óseo, de infartación y de problemas oclusivos en grandes alturas y cuando hay hipoxia severa.

Diagnósticos (Cuadro N° 2)

El diagnóstico de la AD puede hacerse en una etapa temprana del período neonatal, por técnicas electroforéticas, valiéndose de muestras de sangre del cordón umbilical. Estos métodos permiten diferenciar entre las Hbs A, S y C y la Hb fetal. El patrón de la hemoglobina de la AD en el neonato es HbS+F, y entre un 60% y un 80% corresponde a la Hb fetal. No hay HbA.

Actualmente se cuenta con la posibilidad de realizar escrutinio de la AD por medio de tamizaje neonatal, lo cual es una forma menos intervencionista y mucho más accesible a todo recién nacido, además de que la prueba se realiza al mismo tiempo que otras. En Costa Rica, desde el año 2006 se está incluyendo el tamizaje de niños, lo que permite iniciar tratamiento preventivo en forma muy temprana, lo que conlleva a evitar complicaciones a largo plazo.

Al acercarse el niño a los tres o seis meses de edad, la Hb fetal disminuye de 10% a 20% y predomina la hemoglobina drepanocítica. La presencia de HbA junto con HbS y F en la sangre de cordón umbilical, es compatible con el diagnóstico del rasgo o forma heterocigota de HbS (AS), como también de β^+ talasemia más HbS. En este caso, para los tres a seis

meses de edad, el diagnóstico puede comprobarse (patrón S+F+A+A₂), pues la concentración de HbS excede la de la A en la condición HbS/ β^+ tal, con franco predominio de la HbS (> del 50%). A la vez, son útiles los estudios del árbol genealógico para establecer el diagnóstico en el período neonatal.

En la AD el frotis de sangre periférica mostrará drepanocitos irreversibles (10-30%), células densas, basofilia difusa, alguno que otro eritroblasto y a menudo pequeños fragmentos eritrocíticos (esquizocitos), cuerpos de Howell Jolly, células en diana en pequeño número y restos nucleares situados cerca de la membrana eritrocítica, que indican la falta de función esplénica. Se advierten más células en diana en la HbS más β^+ tal, en relación con la HbSS. Se aprecia un aumento del número de leucocitos, y el número de formas en banda es normal, a menos que haya infección. Los neutrófilos hipersegmentados sugieren deficiencia de ácido fólico. El número de plaquetas está aumentado, al igual que las dimensiones de los trombocitos, y a menudo se observan acúmulos de plaquetas. El número de reticulocitos varía en distintos pacientes, pero es comparativamente estable en uno determinado (10-15%). Los factores de la coagulación, como el VIII y el fibrinógeno, así como los productos de degradación de la fibrina y el dímero D están aumentados y se elevan de manera notable durante la crisis. El número alto de reticulocitos en la AD hace que suba el volumen globular medio (VCM). Cuando un paciente presenta VCM inferior a 75 fl, deben considerarse otras posibilidades diagnósticas; por ejemplo, HbS+ talasemia (Cuadro N° 3).

Cuadro N° 2. Valores hematológicos en 14 pacientes drepanocíticos (Costa Rica)		
Hb (g/dl)	7,9 ± 1,4	FeS (μg/dl)= 75,0 ± 31,3
Hto (ml/dl)	25,5 ± 3,5	CTFFeS (μg/dl)= 328,2 ± 69,8
CHCM (g/dl)	31,4 ± 1,3	IS (%)= 25,2 ± 12,7
Reticulocitos (%)	10,2 ± 4,2	Folatos (ng/ml)= 14,7 ± 9,4
DI (%)*	12,4 ± 6,6	B ₁₂ (pg/ml)= 670,0 ± 254,6
HbF (%)	10,6 ± 6,0	
HbA ₂ (%)	3,5 ± 0,33	

*DI = drepanocitos irreversibles

Cuadro N° 3. Hallazgos que hacen dudar el diagnóstico de HbSS

Hb > 9 g/dl
 Reticulocitos < 10%
 DI = < de 5%
 VCM = ↓
 HCM = ↓
 Esplenomegalia (> 12 años)
 Clínica moderada

La HbS con β-tal, enfermedad doblemente heterocigota en la que el paciente hereda el gen drepanocítico y un gen de β-tal, tiene un cuadro electroforético semejante al de la AD (patrón HbS+F). Sin embargo, es llamativo el comprobar un VCM bajo. Es imperativo hacer estudios familiares cuidadosos y estimación exacta de la HbA₂, como también de la HbF. Otras causas de disminución del VCM en la AD incluyen deficiencia de hierro y la α-tal (α^o). La deficiencia de hierro es muy rara en la AD, pero puede resultar de ingreso férrico inadecuado, de pérdida excesiva de hierro por la orina secundaria a hemólisis intravascular crónica o de ambos factores. Este diagnóstico se hace al estimar ferritina y hierro sérico y capacidad total para conjugar el hierro. Ocurre combinación de α-tal y AD cuando el paciente hereda dos genes para HbS y solo 50% del número normal de genes para globina α (-α /-α). El progenitor con el rasgo de α-tal (α^o) y HbAS puede identificarse por electroforesis de Hb que muestra menos del 30% de HbS y el resto es HbA. Cuando la herencia es del haplotipo α⁺ tal o gen silencioso (-α / αα), la concentración de HbS en el heterocigoto AS es menor de 36%. Ambos patrones difieren de las cifras de 38% a 45% de HbS y de 55% a 60% de HbA que se observa en el común AS no complicado con α-tal (genotipo αα/αα; β^A/β^S).

Deberá efectuarse valoración de laboratorio con intervalos regulares en todos los pacientes drepanocíticos;

este incluirá hemograma completo, estimación del número de reticulocitos, cuantificar el porcentaje de DI y plaquetas, y estudios de función hepática. El patrón electroforético de la Hb tipo S+F lo pueden presentar diversos síndromes drepanocíticos ya mencionados: AD (β^S/β^S), enfermedad por HbS y β^o-tal (β^S/ β⁺) por HbS y delta-beta-tal (β^S/δβ^o), rasgo de HbS y PHHbF (β^S/PHHbF), AD más rasgo de α-tal (-α/-α; β^S/β^S), rasgo de la HbS más hemoglobinas anormales de cadena α (por ejemplo, Hb G-philadelphia) o de cadena β (por ejemplo, Hb Korle-Bu).

Diagnóstico prenatal

Adelantos técnicos recientes han permitido diagnosticar drepanocitemia en el feto. En algunos casos esto puede hacerse por aminocentesis, mientras que en otros se necesita la fetoscopia y una obtención de muestras de sangre fetal. Valiéndose de endonucleasas de restricción, se demuestra un fragmento de ADN relacionado con el gen para hemoglobina drepanocítica (HbS). El análisis de las células del líquido amniótico para buscar esta fracción de ADN, brinda la posibilidad de diagnóstico intrauterino en la decimosexta semana de gestación. Estas novedosas técnicas de biología molecular se han visto favorecidas en los últimos años gracias al uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y al reconocimiento de determinados haplotipos de la

HbS, que han permitido advertir, como ya se expuso, que la anemia drepanocítica no es homogénea. De no realizarse el diagnóstico en el periodo prenatal, se debe incluir la prueba en el tamizaje neonatal, que en el caso de Costa Rica se realiza en el Hospital Nacional de Niños (HNN).

Programa Nacional de Tamizaje Neonatal

El Programa Nacional de Tamizaje Neonatal del HNN inició en el 2005 el estudio de hemoglobinas anormales, con el fin de detectar a neonatos que presenten mutaciones puntuales en la molécula de hemoglobina, ya sean portadores (heterocigotos), enfermos homocigotos o dobles heterocigotos.

En el caso de los neonatos con sospecha de la presencia de alguna mutación, este Programa solicita una segunda muestra alrededor del mes de nacido del niño, junto con las muestras de los padres, para hacer el estudio familiar y poder proporcionar un resultado fidedigno, ya que la presencia de hemoglobina gamma en neonatos podría dar un resultado erróneo, por lo cual se requiere corroborar la mutación. Si ninguno de los padres presenta la mutación y el niño permanece positivo, se le solicita una muestra a los seis meses de edad. En este momento los valores de hemoglobina fetal ya han bajado lo suficiente y la interferencia por hemoglobina gamma ya no existe. Es importante hacerle saber a la madre que el padre que se presente

a proporcionar la muestra para el estudio familiar debe de ser el biológico, para esclarecer lo antes posible la presencia o no de la mutación; de lo contrario, a los seis meses el resultado arrojaría la realidad de la herencia del niño.

Todos los resultados del estudio familiar son notificados al centro de recolección de donde provienen las muestras, para que se realice allí el consejo genético pertinente.

Por otra parte, los neonatos que sean detectados como homocigotos para HbS y para HbC, al igual que dobles heterocigotos, son localizados por el Programa y remitidos al Servicio de Hematología, para que inicien el programa de seguimiento y tratamiento para drepanocíticos con que cuenta el Hospital Nacional de Niños.

El Programa Nacional de Tamizaje en estos últimos ocho años tamiza alrededor de 70.000 niños por año en 24 diferentes enfermedades hereditarias, incluidas las hemoglobinas anormales. La estadística indica que 0,02% son enfermos homocigotos o doble heterocigoto, y que 1/52 tamizados presentan el estado heterocigoto.

La distribución por provincia para las dos mutaciones más frecuentes (HbS y HbC) se muestra en el Cuadro N° 4.

Cuadro N° 4. Distribución de mutación S y mutación C por provincia Costa Rica 2006-2013				
Provincia	HbSS (%)	HbAS (%)	HbAC (%)	HbSC (%)
Guanacaste	37	18,8	9,4	0
San José	18	27,3	32,0	37,5
Limón	15	16,5	34,1	37,5
Puntarenas	15	15,2	7,5	0

Fuente: Abarca MG. Programa Nacional Tamizaje Neonatal, Hospital Nacional de Niños.

Haplotipos del gen β^S y su correlación clínica

El término de haplotipos del gen β^S , mencionado anteriormente, se refiere a diversos patrones polimórficos de ADN que flanquean el locus del gen β y que se reconocen mediante el uso de la PCR y de endonucleasas de restricción. Se han descrito los siguientes haplotipos β^S : Benín (Ben); Bantú o Centroafricano (CAR); Senegal (Sen); Camerún (Cam); Árabe Saudí o Asiático. La clasificación de estos guarda relación directa con diversas regiones

geográficas específicas, en las cuales cada haplotipo es predominante.

En América los haplotipos del gen β^S han demostrado ser de gran importancia como marcadores genéticos y antropológicos. Por ejemplo, en diferentes regiones de América Latina el estudio de los haplotipos β^S ha permitido entender mejor las raíces ancestrales africanas de la población negra y han contribuido también a aclarar las intrincadas aventuras del tráfico de esclavos desde el continente negro hasta América. En

el caso particular de Costa Rica, estudios preliminares han logrado corroborar las diferencias ancestrales existentes entre los grupos negros y negroides de las costas Pacífica y Atlántica. De esta manera, mientras que en la costa Atlántica se observa un predominio del Benín y alta frecuencia del Senegalés, en la Pacífica -aunque el Benín es también frecuente- se manifiesta una diferencia significativamente mayor del Bantú, hecho que refleja raíces africanas distintas.

Un reporte del Centro de Investigación en Hematología y Trastornos Afines (CIHATA) permitió valorar de forma presuntiva las características clínicas de la drepanocitosis en Costa Rica, al sugerirse que sus manifestaciones clínicas son especialmente graves en la zona de Guanacaste (litoral pacífico), donde la población negroide posee con mayor frecuencia los haplotipos Bantú y Benín perjudiciales, y al señalar por

qué se observan menos complicaciones en pacientes de raza negra del litoral atlántico (Limón), donde el haplotipo "inocuo" Senegal se encuentra en un 20% de la población.

A pesar de la importancia que pueden tener estos fragmentos polimórficos de ADN como marcadores genéticos, es más relevante aún su correlación con la severidad en las manifestaciones clínicas de la drepanocitosis. En general, se acepta que la herencia de al menos un haplotipo Senegal o Árabe-saudí (Asiático) se relaciona con cuadros sistémicos más benignos que los observados en aquellos individuos con HbSS que manifiestan los polimorfismos Bantú, Camerún o Benín. De estos últimos el CAR o Bantú es el implicado con una anemia drepanocítica más severa, como se observa en el Cuadro N° 5.

Cuadro N° 5. Relación entre la gravedad de la anemia drepanocítica y los diferentes haplotipos de HbS			
Haplotipos β S	Hb total (g/dl)	HbF (%)	Gravedad clínica
Bantú	5,0 – 8,5	5 – 7	++++
Benín	7,0 – 8,5	5 – 7	+++
Senegal	8,0 – 9,0	8 – 10	++
Camerún	8,0 – 9,0	5 – 7	++
Árabe-indio	> 9	15 – 20	+

(++++): Muy grave; (+++): Grave; (++) Moderado; (+) Discreta

Los avances terapéuticos en la AD en las últimas décadas han disminuido en forma significativa la mortalidad. En la década de los 70 el promedio de sobrevivencia era de 14 años y en la actualidad es de 54 años (Cuba, Costa Rica, Jamaica). Sin embargo, la detección del heterocigoto y un apropiado consejo genético y educativo para el paciente, así como un manejo adecuado del homocigoto, son aspectos que deberían estar integrados en el sistema primario de salud de nuestro país y en algún momento deberá declararse a la AD como problema de salud pública.

Si se comparan parámetros fisiológicos, así como morbilidad y mortalidad, es posible concluir que el rasgo de HbS (HbAS) tiene un valor adaptativo neutro en ausencia de la presión selectiva de la malaria, por lo que el destino del gen β^S será el de desaparecer en aquellas regiones en donde la malaria ha sido erradicada.

El rasgo de HbS (HbAS)

Se descubre el rasgo de HbS en aproximadamente el 8-10% de los individuos de raza negra de los Estados Unidos y de Limón, así como de ciertas poblaciones de Guanacaste y en la mayoría de los países de la Cuenca del Caribe y algunos lugares de Brasil. Estas personas no tienen la enfermedad, pero son heterocigotos para el gen drepanocítico y el gen normal de globina β (HbAS). Confundir la tendencia drepanocítica con la drepanocitemia ha originado información equivocada y discriminación, en especial en ciertos países de Centroamérica y del Caribe.

Estudios de poblaciones no han revelado efectos adversos del genotipo AS; aunque hay informes anecdóticos de muerte repentina después de ejercicio intenso en individuos con HbAS. Una vez que se ha hecho el diagnóstico de la HbAS, se deberá comenzar con la educación y la orientación al paciente; se insistirá en el carácter benigno del estado y se brindará información genética. La educación y el consejo

genético constituyen las dos actitudes más importantes para el abordaje de estos trastornos hereditarios, sobre todo en aquellas zonas geográficas donde prevalecen estos defectos. De tal forma, deberá indicárseles a los dos posibles progenitores AS la alta posibilidad (25%) de engendrar un niño homocigoto. En ciertas zonas de Guanacaste (Santa Cruz, Nicoya) y de Limón (raza negra), la frecuencia aproximada de heterocigotos es de un 8,5%. Ante tal estadística, es esperable que de cada 170 uniones una sea entre dos progenitores AS, y la frecuencia mínima esperable de nacimientos con la anemia (HbSS) sería de 1:631.

Los aspectos clínicos relacionados con la HbAS deben sufrir un proceso de educación médica, que permita mirar al paciente con mayor satisfacción y conocimiento profesional, y logre imponer criterios de tratamiento razonables, adecuados tanto en condiciones basales como en las desagradables crisis de dolor o de otra índole. En los hospitales deberá ser obligatoria la atención integral del paciente con un protocolo estandarizado y sostenible, en especial en internamientos por crisis. En este sentido, en Costa Rica, a finales de la década del 2000, la Dra. Marta Navarrete del Servicio de Hematología del HNN elaboró una excelente normativa para el abordaje clínico del paciente con hemoglobinopatías. Posteriormente, en el año 2013, la Caja Costarricense de Seguro Social (CCSS) elaboró el Manual Técnico para la Atención Integral de Personas con Drepanocitosis.

Por otra parte, es importante tener en cuenta que también debe atenderse el estado anímico del paciente drepanocítico, ya que por su especial clínica se le puede catalogar equivocadamente como sidótico o leucémico. Desde pequeño el paciente se siente marginado y su escolaridad se ve perjudicada por los efectos de la dolencia, sin que en realidad ocurran limitaciones intelectuales. Los pacientes drepanocíticos, por lo general, pertenecen a estatus sociales económicamente limitados, por lo que la pobreza y la falta de educación concurren para hacer aún más trágico el padecimiento.

En relación con la atención médica del paciente falciforme, se debe reconocer que aquí en Costa Rica y en otros países de América Latina hay un gran desconocimiento de esta enfermedad por parte de médicos, enfermeros, asistentes sociales, fisioterapeutas y psicólogos. Esta situación se agrega o complica por la falta de unidades o centros de salud con las condiciones básicas para internar y medicar de manera adecuada al paciente.

Sin embargo, por fortuna en Costa Rica se ha estado planificando adecuadamente lo relacionado con la drepanocitosis y en especial con la atención de

los pacientes. En primer lugar, se estableció el 28 de febrero como el día de la drepanocitosis, y en el mes de octubre del 2007 el Estado consideró que la drepanocitosis y las enfermedades relacionadas eran un verdadero problema de salud pública. Esta declaración oficial tuvo un enorme valor para la asistencia médica de los pacientes en el ámbito de clínicas y hospitales, como también de índole laboral y educacional. En estos valiosos logros se debe destacar el papel de la FUNDREPA (Fundación para la Investigación y Apoyo a la Persona con Drepanocitosis y otras Hemoglobinopatías), de la Asociación Costarricense de Hematología y del programa atinente que desde hace 20 años mantiene el CIHATA, de la Universidad de Costa Rica (UCR). También ha sido relevante el apoyo del Ministerio de Salud Pública y de la Organización Panamericana de la Salud (OPS).

La HbC y enfermedad homocigota por HbC

La HbC ($\alpha_2\beta_2^{6(A3)glu-lis}$) fue la segunda variante de la Hb identificada de manera electroforética en 1950 en individuos de raza negra de Norteamérica, y luego definida estructuralmente en 1960. Según investigaciones, la HbC surgió a raíz de una mutación de la HbA, independiente de la ocurrida en la HbS, por un simple cambio de bases en el codón para ácido glutámico en la sexta posición de la cadena β .

En la actualidad, se sabe que esta Hb es la tercera hemoglobinopatía más frecuente en el mundo; la segunda es la HbE. Contrario a la creencia general, es la HbC, y no la HbS, la típica Hb africana, pues salvo pocas excepciones geográficas, se localiza en la región centro-occidental de este continente, con alta concentración del gen (20-28%) en la región Norte de Ghana y en el Alto Volta, y con menor frecuencia al sur de Ghana y en la región más occidental de Nigeria (3%). En Costa Rica hay una marcada diferencia en cuanto a la tasa de esta Hb, según se estudien nuestras poblaciones litorales. En raza negra de Limón, la frecuencia es del 2,4%, en tanto que en la población mestiza de Guanacaste es del 0,3%. Su alta frecuencia en raza negra costarricense es indicativa de su origen africano centro-occidental (Ghana, Alto Volta, Liberia, Sierra Leona, Costa de Marfil, Togo, Benín y Oeste de Nigeria).

Al igual que la HbS, la HbC tiene una solubilidad disminuida dentro del eritrocito, que tiende a cristalizarse. El residuo β^6 lisina, que lleva cargas positivas al pH fisiológico, reemplaza al residuo original de carga negativa -el ácido glutámico-, por lo que las interacciones de los tetrámeros C son presumiblemente polares. Las moléculas de HbC se encuentran en un estado precristalino y no rotan de manera libre en el medio eritrocítico, por encontrarse

densamente empacadas (CHCM alta), hecho que facilita su cristalización. Estudios con el ektacitómetro han indicado que los eritrocitos CC tienen una viscosidad interna incrementada, tal vez debido a una deficiencia de agua; se desconoce el mecanismo por el cual sucede esta pérdida de agua en las células CC. Cabe destacar que la incrementada rigidez celular no requiere la presencia de inclusiones eritrocíticas morfológicamente demostrables.

La anemia por HbCC

Los pacientes que son homocigotos para HbC tienen una ligera a moderada anemia. Muchos casos se diagnostican en los exámenes clínicos rutinarios al detectarse esplenomegalia, ya que los pacientes suelen ser asintomáticos. Sin embargo, presentan episodios intermitentes de dolor abdominal, artralgias y, rara vez, manifestaciones hemorrágicas o priapismo. La esplenomegalia generalmente está presente. El hematocrito se encuentra en un rango entre 25-37% y la Hb entre 9 y 12 g/dl, acompañados de una moderada reticulocitosis (4-8%). La sobrevida eritrocítica está disminuida, con secuestro esplénico. La eritropoyesis no es lo suficiente como para mantener un eritrón circulante normal. La HCM es normal, pero la CHCM se encuentra incrementada. Los hallazgos en el frotis sanguíneo son más impresionantes que el cuadro hematológico dado por los autoanalizadores, por el aumento en el número de esferocitos, y si se busca con intención, podrán observarse cristales de HbC, las más de las veces en forma de barra gruesa. Las células en diana se ven como hinchadas y de diámetro más pequeño que los codocitos de la enfermedad hepática o en la obstrucción biliar. La HbF está ligeramente incrementada y no se observa la HbA₂. Por supuesto, no hay HbA; como tampoco se le encuentra en el genotipo C/β^stal, también descrito en Costa Rica. La condición homocigótica de HbC es rara. La incidencia en los Estados Unidos es de aproximadamente 22/100.000 en individuos de raza negra. En Costa Rica se han detectado dos casos en raza negra.

Enfermedad por HbsSC

La enfermedad por Hbs S y C (SC) es un síndrome drepanocítico doble heterocigoto, resultado de la herencia del gen β^s de un padre y del gen β^c del otro progenitor. Ambas hemoglobinas son de interés en salud pública por su patogenicidad. En América, estas Hbs se encuentran fundamentalmente en raza negra y en poblaciones híbridas, como marcadores indelebles del origen africano de sus ancestros. En nuestro país, la frecuencia de estas Hbs ha sido de 8,2% para la S y de 2,4% para la C en población de raza negra, y de 8,9% para la S y 0,3% para la C en población híbrida o mestiza en Guanacaste. Estos valores demuestran una di-

ferencia bastante significativa en cuanto a la HbC. Si se toman los valores encontrados en raza negra, se podría calcular que la enfermedad por HbSC en esa raza ocurriría en alrededor de uno de cada 2000 nacimientos.

La interacción entre la HbS y la HbC favorece la deformación falciforme. Sin embargo, la enfermedad por SC es de un curso más benigno que la drepanocitosis. No obstante, ciertas complicaciones en la gravidez, así como lesiones óseas y patología ocular han sido reportadas como más frecuentes que en la enfermedad AD.

Enfermedad por HbS y genes de β talasemia y de α talasemia

Dada la frecuencia de la HbS y de genes de β-tal en Costa Rica, no es de extrañar el hallazgo de fenotipos doble heterocigotos productos de esos dos trastornos, tal y como se comentó anteriormente.

Las hemoglobinas inestables

Las Hbs inestables son Hbs anormales que se desnaturalizan de manera espontánea dentro del eritrocito o después de un estrés oxidante (infección, inflamación, acidosis, drogas, oxidantes), precipitando como inclusiones insolubles. Estos llamados cuerpos de Heinz le dieron a esta patología el nombre de anemia hemolítica hereditaria con cuerpos de Heinz. En el presente, se han identificado más de 180 hemoglobinas inestables. La alteración molecular en estas Hbs puede ocurrir en cualquiera de las cadenas de globina; sin embargo, la cadena β es la más frecuentemente comprometida. El cuadro clínico varía desde una forma severa hasta un cuadro con mínima hemólisis.

Por lo general, el interior de la molécula de la Hb se halla densamente empacado por masas hidrofóbicas de aminoácidos interactuantes, unidos entre sí por uniones hidrofóbicas, puentes salinos y fuerzas de Van der Waals.

Las Hbs inestables se caracterizan por una mutación en la vecindad de la bolsa del hem, en un punto de contacto entre las cadenas α y β, requerido para mantener la estructura terciaria de la cadena de globina en el interior hidrofóbico de la molécula; todos estos eventos llevan a una pérdida de la estabilidad del tetrámero. En muchas mutantes de este tipo, el aminoácido polar prolina sustituye a la leucina, que es no polar. Esta alteración permite la entrada de agua a un área normalmente hidrofóbica de la molécula, que inestabiliza su estructura y, por lo tanto, se disocia en cadenas individuales de globina. Una vez disociada, la

cadena de globina anormal se oxida y se desnaturaliza dentro de la célula, con conversión final a cuerpos de Heinz. El patrón hereditario en estas Hbs inestables suele ser autosómico dominante. De tal forma, la enfermedad es clínicamente manifiesta en el estado heterocigoto y puede ser fatal en el estado homocigoto. Es interesante que algunas Hbs inestables han resultado ser el producto de mutación espontánea.

Hemoglobinas con alterada afinidad hacia el oxígeno

Alrededor de unas 118 variantes de Hb tienen una alterada afinidad hacia el oxígeno. Estos desórdenes se caracterizan por un modo de herencia autosómico dominante. Sin embargo, se han reportado mutaciones espontáneas. Los individuos afectados por este desorden de la molécula de la Hb han sido todos heterocigotos, puesto que la condición homocigota es incompatible con la vida. La anormalidad que caracteriza a estas Hbs es el resultado de una sustitución de un aminoácido en el punto de contacto entre las cadenas β . Estos sitios son críticos para la estabilización de la Hb durante su reacción con el oxígeno (oxi y desoxi Hb).

La sospecha de una Hb con afinidad aumentada hacia el oxígeno debe estar siempre presente para el médico en el diagnóstico diferencial de policitemia. Por otra parte, ante un cuadro de cianosis se debe pensar en la eventual posibilidad de una Hb con baja afinidad por el oxígeno.

Metahemoglobinemia por Hbs M

El primer tipo reconocido de hemoglobinopatía fue el causado por una metahemoglobinemia congénita. La sustitución de cualquiera de los residuos de histidina -que soportan el átomo del hierro del heme- da como resultado la oxidación del hierro con la formación de metahemoglobina, la cual no puede ser corregida por la reductasa.

Prácticamente todas las Hbs M se han encontrado en el Japón. Sobre gel de agar de pH 7,0 y por la electroforesis de la Hb en estudio, es posible separar una banda café chocolate de una banda rojo brillante de la Hb normal más catódica. En contraste con las Hbs inestables que pueden también originar meta Hb, las Hbs M no son inestables. La metahemoglobina no sirve como pigmento respiratorio, ya que su estado férrico no se combina con el oxígeno. Los pacientes con Hbs M son cianóticos, pero básicamente normales; su problema es casi de tipo cosmético.

BIBLIOGRAFÍA

- Abarca G, Navarrete M, Trejos R, de Céspedes C, Saborío M. Hemoglobinas anormales en la población neonatal de Costa Rica. *Rev Biol Trop (Int J Trop Biol)* 2008; 56(3): 995-1001.
- Caja Costarricense de Seguro Social. Manual técnico: atención integral a personas con drepanocitosis. San José, Costa Rica: CCSS; 2011.
- El-Hazmi MA. On the nature of sickle-cell disease in the Arabian Peninsula. *Hum Gent* 1979; 52: 323-325.
- Kato G, Gladwin M, Steinberg MH. Deconstructing sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. *Blood Rev* 2007; 21(1): 37-47.
- Lehmann H, Huntsman RG. Man's haemoglobins. Rev Amsterdam: North-Holland Publishing Co.; 1974.
- Odievre MH, Verger E, Silva A, Elion J. Pathophysiological insights in sickle cell disease. *Indian J Med Res* 2011; 134(4): 532-537.
- Pawliuk R, Westerman KA, Fabry ME. Correction of sickle cell disease in transgenic mouse models by gene therapies. *Science* 2001; 294: 2368-2371.
- Rahimi Z, Parsian A. Sickle cell disease and venous thromboembolism. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2011; 3(1): e2011024.
- Rodríguez WE, Sáenz GF, Chaves M. Haplotipos de la HbS: importancia, epidemiología y antropología clínica. *Rev Panam Salud Pública* 1998; 3: 1-8.
- Rodríguez WE, Sáenz GF, Josafoska O, Nagel RL. The African ports of origin of individuals of African descent in Costa Rica: the use of β -gene cluster haplotypes. *Rev Invent Clin (México)* 1994; suppl.: 245.
- Sáenz GF, Alvarado MA, Alfaro E, Barrencea M, Jiménez J, Montero G. Diagnóstico neonatal de hemoglobinopatías. Hallazgo en muestras de sangre de cordón umbilical. *Sangre* 1977; 22: 339-344.
- Sáenz G, Alvarado M, Atmella F, Arroyo G, Jiménez R, Valenciano E. Investigación de hemoglobinas anormales en población costarricense de Guanacaste. *Acta Med Costarric* 1973; 16(2): 147-150.
- Sáenz GF, Arroyo G, Brilla E, Gutiérrez A, Barrencea M, Valenciano E, *et al.* Investigación de hemoglobinas anormales en población de raza negra costarricense. *Rev Biol Trop* 1971; 12: 251-255.
- Sáenz GF, Elizondo J, Arroyo G, Valenciano E, Rojas LF, Jiménez J, *et al.* Hemoglobinopatías en 12.000 escolares costarricenses. *Acta Med Costarric* 1980; 23: 89-99.

Sáenz GF. Hemoglobinas anormales. Acta Med Costarric 2005; 47(4): 173-179.

Serjeant GR. Sickle cell disease. Oxford: Oxford University Press; 1985.

Stuart MJ, Nagel RL. Sickle cell disease. Lancet 2004; 364(9442): 1343-1360.

Dr. Walter E. Rodríguez Romero
Dr. German F. Sáenz Renauld

GENERALIDADES

Las talasemias son alteraciones hereditarias que afectan la síntesis de una o más cadenas de globina, sin perjudicar al grupo heme. Se caracterizan por la producción disminuida de una cadena particular de globina y acumulación de otras cadenas de globinas no afectadas. Las manifestaciones clínicas son variadas y van desde anemias ligeras que pueden pasar desapercibidas, hasta condiciones severas dependientes de transfusiones. Una característica común en los síndromes talasémicos (que se presentan en forma variable de acuerdo a la severidad del defecto) es un cuadro hemolítico, con microcitosis hipocrómica y eritropoyesis ineficaz. Se encuentran entre las enfermedades genéticas de mayor prevalencia y su frecuencia es mayor en toda la región del Mediterráneo, la India, Sudeste Asiático y África Occidental.

ASPECTOS HISTÓRICOS

El término talasemia se deriva de las palabras griegas *thalasa* (mar) y *haima* (sangre), haciendo referencia a las anemias encontradas en poblaciones de la región del Mediterráneo. El primer reporte formal de esta patología hereditaria corresponde a los pediatras norteamericanos Thomas Cooley y Pearl Lee, quienes en 1925 describieron una anemia hereditaria muy severa en infantes norteamericanos. Recientemente, Weatherall presentó algunas alusiones antiguas de posibles casos de talasemia mayor.

A partir de los años sesenta se mejoró la comprensión de la fisiopatología, la genética, el diagnóstico de laboratorio y el tratamiento de las talasemias, gracias al aporte de grandes investigadores como D.J. Weatherall, THJ Huisman, W. Schröder, H. Lehman, entre otros.

CLASIFICACIÓN DE LAS TALASEMIAS SEGÚN EL TIPO DE GLOBINA AFECTADA

- a. Genética: las formas más importantes son las alfa talasemias (α -tal), las beta talasemias (β -tal), la delta-beta talasemia ($\delta\beta$ -tal), la persistencia hereditaria

de la Hb fetal (PHbF) y la gamma talasemia (γ -tal). Esta última tiene importancia únicamente en el período neonatal y fetal. Hay que considerar también las condiciones dobles heterocigotas para las talasemias y otras hemoglobinopatías.

- b. Clínica: se agrupan según la severidad del cuadro. La talasemia menor (condición heterocigota) incluye los cuadros benignos de talasemia, que se caracterizan por una anemia ligera con microcitosis e hipocromía. El extremo opuesto está dado por la talasemia mayor (condición homocigota), donde la anemia es muy severa, con eritroblastosis y dependencia transfusional. Existe una categoría media, llamada talasemia intermedia, que cursa con hallazgos clínicos y de laboratorio entre la condición benigna y la mayor.

GENERALIDADES DE LA SÍNTESIS Y GENÉTICA DE LAS CADENAS DE GLOBINA

Para comprender la naturaleza de las talasemias y su diagnóstico, hay que entender la secuencia de la activación de los diversos genes que regulan la síntesis de las globinas humanas. Las cadenas de globina α y las cadenas γ comienzan su producción antes de la sexta semana de gestación y se mantienen en producción constante. En el caso de las alfa, su síntesis no decae nunca, mientras que las cadenas γ disminuyen de forma paulatina a partir de la semana 30 de embarazo, hasta alcanzar niveles muy bajos más o menos al año de nacimiento. La síntesis de las cadenas β comienza lentamente cerca de la octava semana de gestación y se dispara a partir de la semana 30, coincidiendo con el declive en las cadenas gamma (γ). Finalmente, la producción de las cadenas δ arranca entre la semana 30 y 32 y se estabiliza después del año de edad (Figura N° 1).

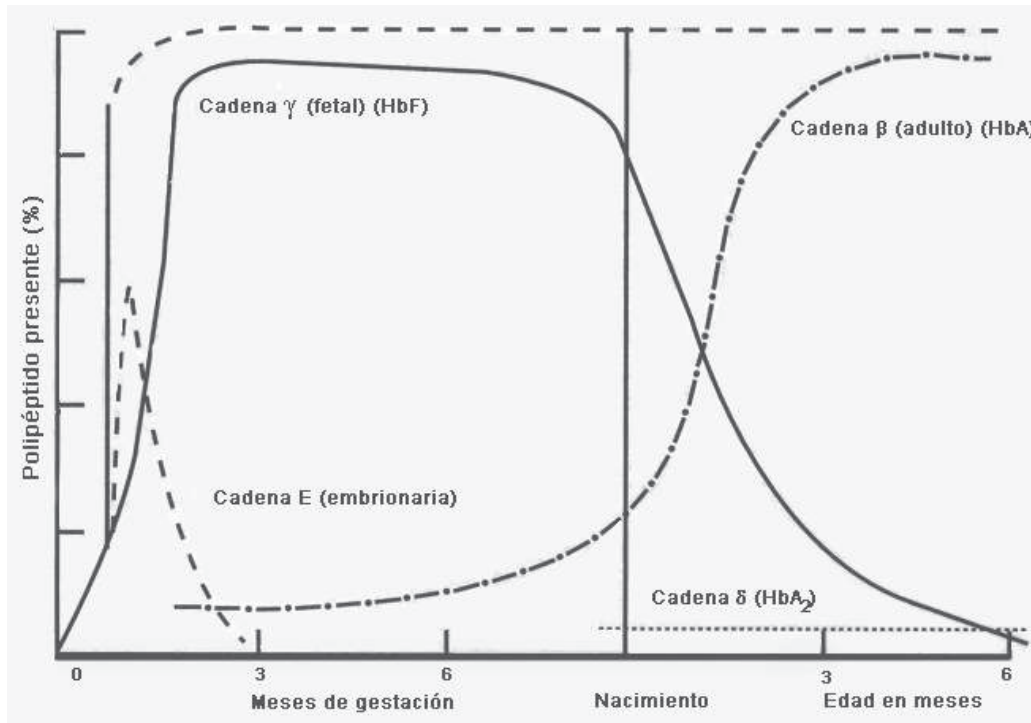


Figura N° 1. Producción de las distintas hemoglobinas humanas.

SÍNDROMES DE BETA TALASEMIA MENOR

La β -tal exhibe una marcada heterogeneidad molecular, describiéndose al presente más de 100 puntos de mutación (genotipos). A nivel de laboratorio, las β -tal se clasifican fenotípicamente en (Cuadro N° 1):

- β^+ -tal: presentan una disminución en la síntesis de cadenas β .
 β^{++} -tal: presentan un desbalance sintético aún más leve. Estos defectos son comunes en raza negra.
- β^0 -tal: no hay síntesis de cadenas β .
- $(\delta\beta)^0$ -tal: no hay producto de genes β y δ en cis.

La existencia de beta talasemia (β -tal) menor en Costa Rica está bien documentada. En investigaciones nacionales se destaca el hallazgo de una frecuencia de 0,25% del rasgo o condición heterocigota de esta enfermedad hereditaria en 12.000 niños de una población escolar representativa de todo el país, y de 0,5% en raza negra y en población guanacasteca. Asimismo, se han descrito algunos reportes de análisis moleculares.

Considerando que es un trastorno de la Hb relativamente frecuente en nuestro medio, se indican a continuación las características clínicas, genéticas y moleculares más importantes de esta patología hereditaria de la Hb, la cual a menudo pasa inadvertida o es erróneamente diagnosticada.

Cuadro N° 1. Algunas caracterizaciones genético-molecular de β -tal y su relación con grupos étnicos y fenotipos (β^0/β^+)

Mutación	Genotipo β^0/β^+	Etnia
- Mutación sin sentido: codón 39 (C-T) codón 61 (A-T)	β^0 β^0	Mediterráneo Europeo Negros
- Mutación de Frameshift - 1 codón 1 (- G)	β^0	Mediterráneo

Cuadro N° 1. Algunas caracterizaciones genético-molecular de β -tal y su relación con grupos étnicos y fenotipos (β^0/β^+)

Mutación	Genotipo β^0/β^+	Etnia
- Mutaciones de codón iniciador ATG - AGG	β^0	Chinos
- Cambios en sitio de Splicing IVS-I nt I (G-A)	β^0	Mediterráneo
- Cambios en regiones consenso IVS-I nt 5 (G-C)	β^+	Asiáticos, chinos, Mediterráneo
-Cambios internos en intrones IVS-I nt 110 (G-A)	β^+	Mediterráneo
- Mutaciones transcripcionales - 31 A-G	β^+	Japoneses
- Mutaciones de poliadenilación AATAAA-AACAAA AATAAA-AATGAA	β^+ β^+	Negros americanos Mediterráneo
- Mutaciones en punto CAP +I A-C	β^+	Indios-Asiáticos
- Globinas inestables β indianapolis (cd 112: Cys-Arg)	β^+	Europeos

Aspectos genéticos y moleculares

El estudio de las talasemias y la construcción de un mapa completo de los genes de la Hb han sido procesos paralelos. Los genes α se encuentran duplicados en el cromosoma 16 y son precedidos, de acuerdo con la posición 5'-3', por los dos genes embrionicos de globina zeta (de la Hb Portland).

El gen β se encuentra en el brazo corto del cromosoma 11, y está íntimamente ligado hacia el lado 5' con el gen δ (de la HbA₂), el cual es precedido por dos loci de cadenas γ (de la HbF), quienes se ven anteceditos por el locus de la cadena embrionica épsilon (de la Hb Gower) (Figura N° 2). Las α tal son fundamentalmente el resultado de pérdidas de partes del cromosoma 16; las β -tal son, por lo general, el resultado de genes no funcionales, salvo la variante $\delta\beta$ tal, que también se produce por deleciones en el cromosoma 11.

En cada estado del desarrollo fetal humano los genes de los cromosomas 11 y 16 son activos. La más temprana Hb es la Gower I ($\zeta_2 \epsilon_2$). Aproximadamente, a

las ocho semanas de gestación empieza a sintetizarse la HbF ($\alpha_2 \gamma_2$). Durante este período transicional se logran demostrar otros dos tetrámeros: la Hb Gower 2 ($\alpha_2 \epsilon_2$) y la Hb Portland ($\zeta_2 \gamma_2$). Justo antes del nacimiento, la HbF es reemplazada de manera gradual por la HbA ($\alpha_2 \beta_2$). Esta inactivación de las cadenas γ se ha asociado a la acción de un "locus de región control" (LCR) y a factores de transcripción como el EKLF, aunque el mecanismo permanece oscuro. Luego hace su aparición la HbA₂. Algunas células persisten con HbF; de hecho, en el adulto se encuentra alrededor de un 1% de esta fracción.

Como las talasemias son un grupo de desórdenes en los cuales se halla reducido el grado de producción de una o más de las cadenas de globina, y como existen varios tipos de cadenas polipeptídicas en las hemoglobinas humanas, así son los diferentes tipos de talasemia; por ejemplo α , β , δ y γ tal. Se puede entender que las α talasemias afectan a todas las Hbs normales del feto y del adulto, ya que forma parte constitutiva de cualquier hemoglobina.

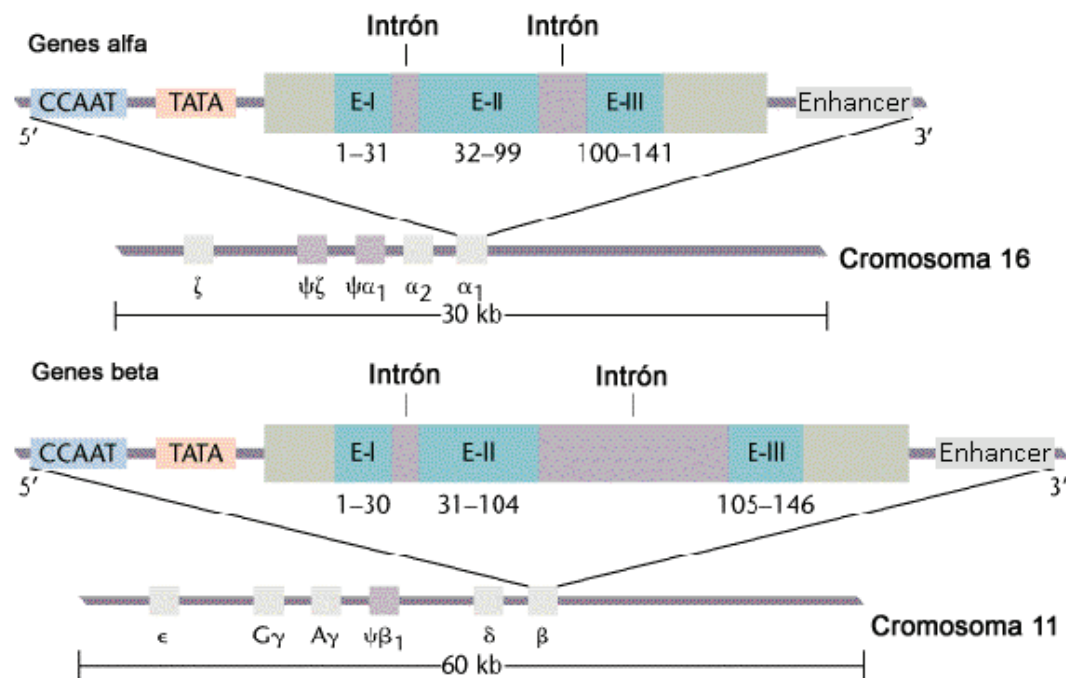


Figura N° 2. Esquema y localización de los genes de α y β globina.

Se han descrito Hbs estructuralmente anormales, denominadas Hbs talasémicas, que presentan un cuadro fenotípico de talasemia y, por lo tanto, se incluyen dentro de los síndromes talasémicos. Algunas de estas variantes son: Hb Constant Spring, Hb E, Hb Kansas y Hb Lepore.

Aunque la β -tal se hereda de forma recesiva, se han descrito algunos casos de patrón dominante. Son anecdóticas las mutaciones espontáneas.

El comienzo, la elongación y la terminación de las cadenas β son normales en β^+ -tal. La evidencia presente indica que el defecto molecular de fondo en la frecuente β^+ -tal es una producción reducida de ARNm, que puede resultar de una anomalía en el proceso de la transcripción del ARNm. Como resultado de ello, la síntesis de cadenas β se encuentra disminuida entre un 5% y un 30% de lo normal. La β^0 -tal es un desorden aún más heterogéneo a nivel molecular. En algunos casos no hay ARNm detectable en el citoplasma y en otros se ha demostrado un ARNm anormal o inactivo.

El locus del gen de globina β posee tres sitios promotores importantes, que son una caja TATA, dos secuencias CACACCC y una región CAAT (Figura N° 2). La activación del gen β es compleja e incluye, como ya se citó para los genes γ , su control por una serie de factores reguladores denominados "locus de región control" (LCR) y otros factores que interaccionan con secuencias promotoras o sitios facilitadores ("enhancers"), como el GATA-1, el EKLF, entre otros.

Además, el gen está constituido por tres exones y dos intrones. Los mecanismos que regulan la transcripción no se conocen del todo, pero implican probablemente secuencias de ADN que distan algunos centenares o quizá millares de nucleótidos del gen de globina.

La transcripción se origina en correspondencia con el "cap site" (que especifica la señal para la incorporación de un nucleótido particular, la 7-metil guanosina); y la presencia de la secuencia ATA, situada a una distancia de 23 nucleótidos del "cap site", es importante para determinar el punto preciso de inicio. Como se sabe, ciertas enzimas nucleares eliminan el ARN que corresponde a los intrones y unen el ARN correspondiente a los exones; además, otro sistema enzimático incorpora moléculas de poliadenosina (poli A) al extremo 3' del ARN.

Con base en estos conceptos, las alteraciones en las beta talasemias se pueden dividir en:

- Defectos de maduración de ARN nuclear.
- Defectos de la traducción del ARNm.
- Defectos de la transcripción.

Estos tres tipos de defectos están bien documentados en el plano molecular.

a. Defectos de la maduración del ARN nuclear

β^0 talasemia

La secuencia CGTGA, colocada al inicio del segundo intrón (IVS-2), es mutada con GAT GA, con modificación del par crítico de nucleótidos GT. El “empalme” (*splicing*) no puede realizarse en forma adecuada. Este tipo de alteración se ha descrito en pacientes italianos.

β⁺ talasemia

Una secuencia TTGGTCT, situada en el primer intrón (IVS-1) es mutada a TTAGTCT. Así se generan el par de nucleótidos críticos AG, en el lugar del “empalme”; este puede efectuarse erróneamente uniendo el extremo del primer exón con un fragmento interno del intrón, en lugar de hacerlo con el inicio del segundo exón. Por esto, el ARNm que se forma es anómalo y se destruye en gran parte *in vivo* por su inestabilidad. Solo se produce una pequeña cantidad de ARNm normal y por ello se trata de una β⁺ tal. Se halla en Chipre, Grecia y otras regiones del Mediterráneo, incluida la población italiana.

b. Defectos de traducción del ARNm

B⁰ talasemia (codón de terminación precoz)

Se ha descrito en individuos chinos; el triplete de nucleótidos AAG, que especifica el aminoácido 17 (lisina), muta a TAG. En el ARN donde U (Uracilo) corresponde a T (timina), el nuevo codón UAG indica una mutación sin sentido, y se interrumpe la traducción. De igual forma, en italianos y españoles la secuencia CAG (que corresponde a glutamina en posición 39) muta a TAG. En ambos casos, los ribosomas no logran traducir completamente el RNA, porque se detienen al llegar a la señal de bloqueo (codón terminal UAG). En cualquier caso, se trata de una β⁰ talasemia. Esta alteración es muy frecuente en la población iberoamericana y se ha encontrado en familias costarricenses.

c. Defectos transcripcionales

Son alteraciones que se producen por mutaciones en las regiones promotoras CAAT y TATA.

Se han descrito múltiples mutaciones, asociándose con la expresividad β⁺ o β⁰ y con diversos grupos humanos, brindando una enorme heterogeneidad genética y clínica.

En la β-tal la reducción en la síntesis de cadenas β resulta en un incremento en las proporciones de HbA₂ (α₂ δ₂) y de HbF (α₂ γ₂). El típico exceso de cadenas α en β⁰-tal no forma tetrámeros, por lo que no se forma la molécula α₄ para las condiciones menores. La típica β

tal menor se caracteriza por un incremento de la HbA₂, mientras que en la δβ tal es la HbF la que se encuentra elevada.

Las β talasemias son, entonces, desórdenes que surgen en última instancia, en virtud de una defectuosa síntesis de la cadena β de la HbA; esta cadena es deficiente en su síntesis, pero estructuralmente es normal. El desbalance sintético da como resultado no solo una defectuosa hemoglobinización de la célula (hipocromía), sino también el fenómeno hemolítico, tanto intramedular como periférico. Esto se debe a la precipitación intracelular de la cadena α, la cual es sintetizada con un exceso relativo, que daña los eritroblastos en desarrollo. Estos eventos son leves en la β tal menor, pero marcados en la forma mayor o enfermedad de Cooley.

Fisiopatología de los Síndromes de β-tal

En estos síndromes se observa un desbalance sintético entre cadenas β y no β (razón normal = 1,0 ± 0,05), con síntesis normal de cadenas α respecto de la β que se halla deprimida (β⁺) o ausente (β⁰). Esto sugiere que un exceso de cadenas libres α no se conjugan con otras cadenas dentro del eritroblasto y, por ende, en el eritrocito.

Hay dos tipos de β -tal mayor clásicas: la β⁺-tal, en donde se produce algo de HbA (con predominio de HbF y A₂) y la β⁰-tal, donde del todo no hay producción de HbA (Cuadros N° 2 y N° 3). Las cadenas α libres en exceso son inestables y originan los cuerpos de inclusión que se encuentran en los precursores de la serie roja. Esta apoptosis incrementada se asocia con un aumento en la expresión de la fosfatidilserina (señal de remoción prematura de eritroblastos con rigidez en el citoesqueleto por macrófagos medulares). En las formas severas de beta talasemia, además de la hemólisis, hay hipercoagulabilidad. Ambas son producto de la oxidación de las subunidades α, β, o γ, lo cual lleva a la formación de hemicromos. Estos se unen o modifican diversos componentes de la membrana. Luego de la precipitación como cuerpos de inclusión, el grupo heme se desintegra y se libera hierro que cataliza la creación de formas inestables de oxígeno, los cuales, entre otros daños, propician la generación incrementada de fosfatidilserina, lo que esto provoca una activación plaquetaria y del sistema de coagulación. Estos eventos son ligeros en la β tal menor. Iguaes comentarios pueden hacerse en torno a la variedad de β tal denominada δβ tal o F-tal (Cuadro N° 2). En esta condición heterocigota el cuadro hematológico es muy similar al de los dos tipos clásicos de β tal. Se caracteriza, eso sí, por niveles altos de HbF (5-20%), con HbA₂ ligeramente reducida.

Los eritrocitos β talasémicos presentan varias anormalidades metabólicas. La membrana es más permeable al K^+ y tiene una habilidad reducida para generar ATP. Es muy probable que la formación de cuerpos de inclusión de cadenas α sea, de alguna manera, responsable de estos cambios fisiopatológicos de la membrana. Podría ser que la membrana también sufra daño por trauma mecánico cuando los cuerpos de inclusión son removidos de las células por "picoteo", durante sus pasajes en los sinusoides esplénicos. La función anormal de la membrana ocurre en mayor grado en aquellas células con mayor desbalance de cadenas; por ello, las células con un número relativamente alto de cadenas gamma (HbF), tendrán menos daño de membrana y una sobrevida más prolongada.

Los defectos en las síntesis del heme han sido claramente demostrados en β -tal, donde el heme inhibe (por retroalimentación) a la ALA-sintetasa, enzima responsable de esa síntesis. Este defecto en la producción normal del heme es tal vez resultado de su acumulación, producto de la defectuosa síntesis

de cadenas β y, por ende, de la Hb (hipocromía). Asimismo, existen cantidades incrementadas de hierro dentro de los eritroblastos, que al sobrecargar a las mitocondrias podría ser responsable de algunos de los cambios metabólicos observables en los precursores, tales como la regeneración disminuida de ATP. Todas estas observaciones señalan la importancia del exceso de cadenas α en la patogénesis de la β -tal, tanto en sus aspectos hemolíticos como de eritropoyesis ineficaz. El grado de eritropoyesis ineficaz en unión de una vida acortada de los eritrocitos, produce el cuadro de anemia que se observa en estos síndromes, el cual es ligero en las formas menores y muy severo en la talasemia mayor (enfermedad de Cooley).

En la forma severa la tasa elevada de HbF, con alta afinidad por el oxígeno, llega a producir anoxia tisular y, por lo tanto, un fuerte estímulo para la producción de eritropoyetina, con marcadísima expansión de la médula ósea, que puede llegar a un eritrón fijo hipertrofiado tanto como 50 veces lo normal. Es claro que estos eventos fisiopatológicos no suceden en tal grado en las formas menores o rasgos de β -tal.

Cuadro N° 2. Tipos de beta-talasemia clásica			
Tipo	Heterocigota	Homocigota	Defecto molecular
β^0	Tal menor, ~5% HbA ₂	Tal mayor; no hay HbA, ~98% HbF	Heterogéneo; ARNm no funcional por mutaciones sin sentido y de entrecruzamiento. También por defectos serios en la maduración nuclear del ARN.
β^+ (Mediterráneo)	Tal menor, ~5% HbA	Tal mayor, ~10-20% HbA ~70-80% HbF	Defectos de maduración nuclear del RNAm, y mutaciones transcripcionales, en especial.
β^+ (negro β^{++})	Tal menor, ~5%	Tal intermedia, ~80-50% HbF ~50-70% HbA	Idem.
β -tal con HbA ₂ normal (Tipo 1) (Silencioso)	Hematología prácticamente normal; HbA ₂ y HbF normales	Ligera tal intermedia, 10-30% HbF; HbA ₂ alta	No definido.
β -tal con HbA ₂ normal (Tipo 2, "INMÓVIL")	Rasgo talasémico clásico; HbA ₂ y HbF normales	No descrita.	No definido.

Cuadro N° 3. Hallazgos hematológicos en síndromes de β talasemia menor o heterocigota

Desorden	Anemia	VCM	Morfología eritrocítica anormal	HbA ₂	HbF	Razón sintética β/α (*)
β^0 tal	$\pm$	D	+	I	N-I	D
β^+ Mediterráneo	$\pm$	D	+	I	N-I	D
β^{++} tal (africano)	$\pm$	D	++	I	N-I	D-N
β tal portador severo	++	D	++	I	N-I	D
β tal portador silente	-	N	-	N	N	D
β tal portador inactivo	$\pm$	D	+	N	N	D
β^0 tal	$\pm$	D	+	D-N	I	D-N
β^+ tal (silente)	-	N	-	N	N	D-N
$\delta\beta$ tal	+	D	+	N	N	D
Hbs Lepore	+	D	+	D-N	N-I	D
Hb K Woolwich	$\pm$	D	+	I	N	D
Hb Knossos	$\pm$	D	$\pm$	D	N	D

+ = presente; - = ausente; N = normal; D = disminución; I = incremento. (*) normal = 1.0; D = 0,5 -0,7.

Nota: no se incluyen en el cuadro los diversos síndromes de persistencia hereditaria de HbF, los cuales presentan mucha semejanza molecular con las $\delta\beta$ tal; en la actualidad se les considera ligadas a dichas talasemias, pero a diferencia de estas hay una excelente compensación a través de la producción adecuada de HbF.

Aspectos clínicos

En contraste con la intensa sintomatología asociada con la β -tal mayor, el paciente con la condición menor a menudo no se da cuenta de su anormalidad hematológica, ya que por lo general no son sintomáticos y pueden no ser anémicos. En la mayoría de las veces, el examen físico es normal, pero en algunos raros casos puede palparse la punta del bazo.

Estos pacientes no presentan ninguno de los problemas clínicos asociados con la talasemia mayor, como hipertrofia de los huesos faciales (debida al aumento de la hematopoyesis), déficit de crecimiento y desarrollo, aumento de la pigmentación cutánea (por el incremento de los depósitos de hierro) y daño tisular (por la hemosiderosis). En unos pocos casos, el tipo clásico de β -tal menor con HbA₂ alta presenta una inusual severidad clínica con moderada anemia, esplenomegalia y cambios óseos, con complicaciones tardías, tales como úlceras en piernas y litiasis biliar. Se sugiere que la esplenectomía puede disminuir la severidad de la anemia al incrementarse la sobrevida eritrocítica.

Los casos sintomáticos de β -tal menor -que son raros-, deben ser objeto de un estudio profundo, tanto analítico como genético, antes de clasificárseles así. El nivel de hemoglobina en la talasemia menor clásica está casi siempre entre 11 y 13 g/dl, es decir, alrededor de 1 a 3 g por debajo del rango normal para edad y sexo; sin embargo, existe a menudo un grado moderado de eritrocitosis que origina una disminución de la HCM y del VCM. Al estudiarse un grupo de niños β -tal heterocigotos, a intervalos de tres meses desde el nacimiento hasta un año de edad, se notó que los niveles de Hb fueron consistentemente de 1 a 2 g/dl menores a través del primer año de vida, en relación con un control de niños normales de las mismas madres. El VCM y la HCM fueron también significativamente menores y la proporción de HbF declinó de manera más lenta en los talasémicos (Cuadro N° 4). La anemia microcítica hipocrómica de la β -tal menor no responde al tratamiento con hierro, y sin duda la administración prolongada o excesiva de hierro a estos pacientes supone el riesgo de una hemosiderosis. No obstante, una deficiencia de hierro conjunta puede disminuir los niveles de la HbA₂ y confundir el diagnóstico.

Cuadro N° 4. Características clínicas y genéticas de las beta talasemias			
Hallazgos	Talasemia menor	Talasemia intermedia	Talasemia mayor
Severidad clínica	Leve o asintomática	Moderada	Severa
Genética	Heterocig/homocig formas moderadas HbH	Mezcla de heterocigotos, formas dominantes	Homocigotos, formas dominantes
Alteraciones físicas	Ninguno o leve	Moderados	Marcados
Esplenomegalia	Ausente	Ligera o moderada	Marcada
Hepatomegalia	Ausente o rara	Ausente o ligera	Marcada
Ictericia	Usualmente negativa	Ausente o ligera	Importante
Cambios óseos	No se presentan	Leves	Importantes
Cambios hematológicos:			
Hb (g/dl)	> 10	7-10	> 6
Anisopoquilocitosis	Ligera	Moderada	Marcada
Eritroblastosis	No hay	Ligera o moderada	Marcada
Retis (%)	NL o lig. altos	Lig. altos	Muy altos
Transfusiones	No se requieren	Ocasionales	Constantes

La médula ósea en esta condición menor muestra ligera hiperplasia eritrocítica de pobre hemoglobinización, con ocasionales inclusiones; la eritropoyesis ineficaz es ligera, pero la sobrevida eritrocítica es normal o cercana a ella. En una serie de 15 mujeres gestantes con β -tal menor, cuatro eran deficientes en hierro, como se dedujo por los niveles de hierro en el suero y los depósitos en la médula ósea, mientras que cinco presentaban una hemosiderosis debida tal vez al tratamiento previo. La gestación en mujeres con β -tal menor se complica primariamente por un aumento en la gravedad de la anemia durante las 24 a 28 semanas de gestación. En un total de 308 pacientes, recopilados de la literatura médica, el nivel medio de hemoglobina fue de 9,3 g/dl, lo que es compatible con una gestación normal; y en la mayoría de casos, no fue necesaria ninguna otra terapéutica. Sin embargo, se puede descender de este nivel hasta los valores considerados como anémicos intensos, donde se requieren incluso transfusiones para evitar complicaciones graves.

En el caso de las mujeres embarazadas con β tal menor, se tiene conocimiento de que el 14% de ellas suelen presentar un valor de Hb inferior a 7,1 g/dl. Además, diversos estudios indican que algunas gestantes desarrollaron insuficiencia cardíaca congestiva secundaria a anemia grave; pero lo usual es que el

embarazo y el parto transcurran sin problemas. El por qué en una minoría de mujeres gestantes β talasémicas pueden surgir una serie de problemas a causa del agravamiento de la anemia, no está claro aún.

Cuando los individuos beta talasémicos deciden someterse a los cuidados médicos, en ocasiones suelen ser diagnosticados erróneamente de anemia con ictericia leve o el proceso es clasificado como una forma intermedia de talasemia, al pasarse por alto una enfermedad asociada. De hecho, es común la confusión con una anemia ferropriva. Otro error es la incapacidad para informarle al paciente que la talasemia menor es un cuadro benigno con una expectativa normal de vida. Es importante el detectar a los individuos heterocigotos, a fin de prevenir las formas homocigotas y brindar consejo genético.

En el frotis de sangre de la β tal menor se observa microcitosis, hipocromía, punteado basófilo y células en diana (codocitos), pero estos cambios morfológicos no son patognomónicos y pueden observarse, salvo los dos últimos hallazgos, en un simple déficit de hierro. En todo caso, el diagnóstico en la mayoría de pacientes debe establecerse con certeza, a través de la electroforesis de la hemoglobina y con la demostración de un aumento en los niveles de HbA₂ de HbF o ambas.

Diferenciación entre β -tal menor y anemia ferropriva

El problema práctico más común en los estudios de talasemia es distinguir la β -tal menor o heterocigota (sea β^0 , β^+ , $\delta\beta$ y la forma α^0) de la anemia por deficiencia de hierro. El diagnóstico se hace al determinarse la disminución en hierro sérico y en la ferritina (anemia ferropriva) y la elevación de HbA₂ o fetal para las beta talasemias. La protoporfirina eritrocítica libre o la ligada al Zinc (PP-Zn), en la mayoría de los casos se halla incrementada en la deficiencia de hierro, pero no en el rasgo de β -tal. Si hay déficit de hierro y β -tal menor conjunta, los niveles de la HbA₂ pueden disminuir y solo se restauran luego de la terapéutica con hierro. A un nivel de Hb no menor de 10 g/dl, la deficiencia de hierro usualmente no se asocia con una obvia microcitosis e hipocromía, hecho que sí es característico en los rasgos de β -tal y α -tal. Por lo tanto, una regla muy útil es que cuando se detecte microcitosis e hipocromía (observable ya sea en el frotis sanguíneo o por medio de contadores electrónicos) asociada a niveles de Hb de 10 g/dl o mayores, esto podría significar un rasgo talasémico y no una deficiencia de hierro.

En casos no complicados de β -tal, lo usual es que el hemograma indique un hematocrito normal o ligeramente descendido, que al confrontarlo con el nivel de Hb origina un CHCM manual menor de 31 g/dl. Asimismo, el diagnóstico de β -tal menor se ve sugerido por otra discrepancia: una llamativa anomalía morfológica y cromática de la población eritrocítica versus ligera o inexistente anemia. Por otra parte, en un buen número de pacientes llama la atención el hallazgo de un VCM extremadamente bajo (< de 70 fl), cuando en la deficiencia de hierro, si bien es cierto que se pueden observar valores tan bajos, este se asocia con un cuadro de anemia severa. Otro hallazgo importante es que en la β -tal menor la microcitosis es más acentuada que la hipocromía, por lo que el VCM es más bajo que el HCM. Dos datos muy útiles aportados por el analizador hematológico automatizado es la presencia de eritrocitosis microcítica en las talasemias contra valores normales en la deficiencia de hierro; además, se han descrito valores mayores de RDW (ADE) para la anemia por deficiencia de hierro.

El diagnóstico bioquímico de certeza de la β -tal menor se realiza a través de la electroforesis de hemoglobina o HPLC y por el aumento en los niveles de la HbA₂, la HbF o de ambas. Es obvio que la anemia microcítica hipocrómica de la β -tal menor no responde al tratamiento con hierro y, sin duda, la administración prolongada o excesiva de hierro a estos pacientes supone el riesgo de una hemosiderosis.

Diagnóstico de laboratorio de β -tal menor

El diagnóstico de beta-talasemia menor pasa a menudo inadvertido por muchos años; es muy importante establecer el diagnóstico lo más temprano posible, para que el paciente deje de sufrir continuas investigaciones y tratamiento con hierro. Por lo general, es un diagnóstico de laboratorio, pues no puede ser sospechada solo con las evidencias clínicas, al tratarse de trastornos que básicamente y salvo complicaciones, son asintomáticos.

La gran heterogeneidad molecular de las β -tal heterocigotas imposibilita su caracterización por un solo método de laboratorio. Sin embargo, con raras excepciones, todos los heterocigotos caen en los cuadros comunes que se describen a continuación.

1. Hematológicos:

- Anemia ligera: hallazgo frecuente, pero no universal, y varía con el tipo de rasgo talasémico implicado. El traslape de los niveles de Hb con el rango normal es muy grande como para que la cifra de Hb sea útil en el diagnóstico de casos individuales.
- Índices eritrocíticos bajos: es la hemoglobina corpuscular media (HCM) la que da mejor discriminación, aun superior al volumen corpuscular medio (VCM). No resulta conveniente del todo la concentración de Hb corpuscular media (CHCM) (al menos cuando se le obtiene por métodos electrónicos). Es común encontrar un HCM menor de 23 pg o un VCM menor de 70 fl, por lo que el escrutinio de β -tal a través de contadores electrónicos es bastante eficaz.
- Alteraciones de la morfología eritrocítica: lo usual es un hallazgo de microcitosis, hipocromía, células en diana, poiquilocitosis y punteado basófilo (este último en sangre nativa, sin EDTA).
- Fragilidad osmótica (F.O.) disminuida; de gran valor para el tamizaje: con una solución de NaCl al 0,36%. Este procedimiento puede dar falsos negativos en un 2% de los casos, pero es un método simple y de bajo costo.
- Eritrocitosis (> 5,5 millones/ul).

2. Bioquímicos:

Los hallazgos característicos difieren según el defecto molecular:

- Incremento de la HbA₂, el cual se encuentra en la β^0 y la β^+ -tal. Puede encontrarse un ligero aumento de la HbF.

- b. Incremento de la HbF, pero no el de la HbA₂, característico de la $\delta\beta^0$ -tal.
- c. Presencia de cadenas $\delta\beta$ híbridas por entrecruzamiento (Hbs Lepore), observadas por electroforesis.
- d. Disminución de la síntesis de cadenas β a través de estudios biosintéticos de globina (razón β/α menor de 1,0). En ocasiones, esta

situación puede ser enmascarada por una α -tal coincidental.

Perfil diagnóstico

Para los efectos diagnósticos de los síndromes talasémicos menores, en la Figura N° 3 se propone un flujograma, partiendo del hemograma y la electroforesis de Hb.

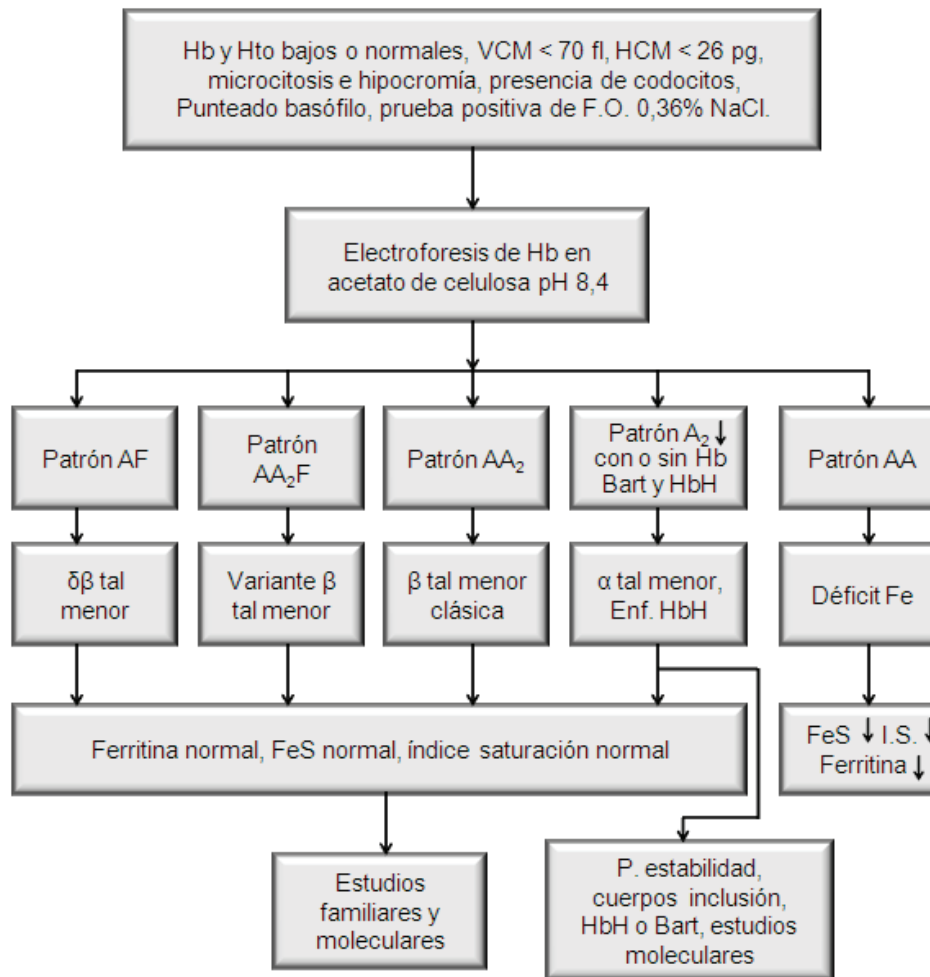


Figura N° 3. Diagnóstico de talasemia.

Se procede a una electroforesis de escrutinio en acetato de celulosa a pH alcalino, donde se determina la elevación de la A₂ o fetal. Ya a este nivel se puede presumir qué tipo de talasemia se presenta. Posteriormente, se cuantifican la HbA₂ y la HbF. Cualquier otra fracción puede cuantificarse por electroforesis-elución o HPLC.

Cabe destacar que en el flujograma no se indica la posible presencia de las rarísimas Hb Constant Spring (fenotipo de Alfa-tal, con cantidades menores del 1-2% y con migración lenta, aún más que la HbA₂)

y Hb Lepore (fenotipo de beta-tal, usualmente en concentraciones entre 5% y 1-5%, con una posición electroforética semejante a la HbS), para no complicar la lectura.

En cuanto a los índices VCM y HCM, estos no proveen evidencia concluyente para el diagnóstico diferencial. Por esto, el diagnóstico convencional de los síndromes de beta-tal requieren de la electroforesis de la hemoglobina, la cuantificación de las fracciones menores (por ejemplo, hemoglobinas A₂ y F) y, si es pertinente, la medición cuantitativa del FeS y la

determinación del I.S. Respecto a los estudios de síntesis de globina, restringidos a pocos centros de investigación, debe mencionarse que estos no son apropiados para análisis en gran escala y en ocasiones no son concluyentes.

Poblaciones con β talasemia

Los genes β talasémicos se encuentran ampliamente distribuidos en las poblaciones mediterráneas, el Medio Este, parte de la India y Pakistán y a través del sureste de Asia. En estos grupos humanos las frecuencias del gen varían entre el 5% y el 20%. Las β -tal son raras en África (0,5%), excepto por algunos grupos aislados en el África Occidental (2%), en Liberia y en partes de África del Norte. La β -tal se presenta de manera esporádica en todos los grupos raciales, por lo que el fenotipo racial no excluye el diagnóstico de ninguna forma de β -tal. La evidencia relaciona la alta frecuencia del gen en algunas zonas con existencia previa de *Plasmodium falciparum*. La F tal o $\delta\beta$ tal, se localiza fundamentalmente en las poblaciones raciales del Mediterráneo, con ocurrencia esporádica en el Medio Este y en África. En cuanto al gen silencioso del β -tal, en Grecia lo poseen uno de cada diez individuos con β -tal.

En Costa Rica, la investigación ha destacado la siguiente frecuencia:

- γ 0,25% del rasgo clásico en 12.000 niños escolares, es decir, un caso por cada 400 niños.
- γ 0,50% en 1.000 niños preescolares del cantón de Santa Cruz, Guanacaste.
- γ 0,5% en raza negra hospitalaria.

Además, de 130 casos estudiados de beta talasemia menor o heterocigota, un 86% eran costarricenses caucásicos, quedando el resto (14%) repartido en individuos extranjeros o con ancestros de otros países; por ejemplo, un 7% correspondía a personas de ascendencia italiana. De acuerdo con los resultados de ese estudio, se destaca una mayor frecuencia de la variedad clásica de la β -tal menor tipo HbA₂ alta (82,4%), con respecto a la del tipo F o $\delta\beta$ -tal (17,6%). Asimismo, se demuestra que, como era de esperar, en 104 casos (81%) privaron niveles de Hb iguales o mayores de 11,0 g/dl, siendo por el contrario menor esta cifra (19%) en la mayoría de los portadores que presentaban infección y/o deficiencia de hierro o, en su defecto, gravidez.

En el Cuadro N° 5 se resumen los fenotipos de talasemia hallados en Costa Rica. Es importante mencionar que los estudios genéticos han mostrado un predominio importante de la mutación sin sentido en el codón 39.

Cuadro N° 5. Fenotipos de talasemia detectados en Costa Rica

Talasemias;
 β^+ tal, β^0 tal
 $\delta\beta$ tal
 β tal con F alta
 Intermedia $\beta+\beta^+$
 Mayor $\beta+\beta^0$
 Mayor $\beta^0\beta^0$
 HbC/ β^0 tal
 HbS
 PHHbF
 Enfermedad HbH
 α tal (con Hb Bart en neonato)(α^0, α^+)

Talasemia mayor (Enfermedad de Cooley)

La talasemia mayor es un cuadro que se caracteriza por una anemia severa, usualmente detectada entre los 6 y 12 meses de vida, con eritroblastosis marcada y dependencia de transfusiones periódicas. Como parte del mecanismo de la excesiva respuesta eritropoyética medular, se ha demostrado en modelos animales una sobreexpresión de JAK2 y STAT5; moléculas que favorecen la proliferación de la serie roja y le eritropoyesis ineficaz.

El principal problema clínico es la hemocromatosis que daña distintos tejidos, en especial el cardíaco, producto de las trasfusiones constantes. Aun con los modernos procedimientos de quelación de hierro para remover el exceso de este metal de los depósitos, la expectativa de vida en la forma mayor clásica es de 25 a 30 años, como promedio. Se ha postulado también que, además del hiperferrismo por trasfusión, en la talasemia mayor hay una mayor absorción de hierro que la requerida para la eritropoyesis, debido a una expresión muy baja de la hepcidina, aparentemente influenciada por uno o varios factores eritroides no identificados, que se encuentran muy aumentados en condiciones de gran apoptosis eritroide (como ocurre en la Enfermedad de Cooley).

El diagnóstico prenatal en la β -tal (9-11 semanas de gestión) es posible al detectarse directamente las distintas mutaciones con reacción en cadena de la polimerasa o por secuenciación; además de que el gen β es pequeño y simple para ser un gen humano, pues tiene un tamaño de 1,5 kb y solo dos intrones. El que exprese un determinante β -tal como supresor (β^0) o depresor (β^+) dependerá de la severidad de la mutación llevada a cabo en el ADN, caracterizándose el tipo β^0 por la total ausencia de síntesis de cadenas β . El genotipo de dos alelos mutantes β tal de carácter supresor, se hace evidente al no encontrarse HbA en el hemoglobinoграмма. Sus padres, como es de

esperarse, serán poseedores del rasgo o forma heterocigoto de β -tal menor. La presentación del cuadro clínico y los hemogramas resultan ser compatibles con esa forma severa de β talasemia mayor, ya deletérea desde temprana edad de la vida.

El patrón hemoglobínico de la talasemia mayor depende, entonces, de si la herencia de los progenitores es β^0 o β^+ . Si los dos genes son β^0 el patrón electroforético es FA_2 , con más de 90% de HbF, con niveles variables de HbA_2 y ausencia total de HbA. Cuando se heredan dos genes β^+ o $\beta^0\beta^+$, la electroforesis se reporta FAA_2 (con predominio HbF, HbA_2 elevada y algo de HbA).

La anemia severa cursa con un alto cómputo relativo de reticulocitos, a pesar de que es bajo en términos absolutos con relación al grado de anemia. Este fenómeno se debe a la importante eritropoyesis ineficaz que caracteriza a esta hemoglobinopatía. A pesar de que el principal pigmento respiratorio es la HbF, en términos absolutos no es lo suficientemente alto como para compensar de manera adecuada la ausencia de síntesis de HbA. Como resultado de ellos, hay una fuerte hiperplasia eritroblástica en médula ósea de carácter ineficaz.

Se pueden buscar cuerpos de inclusión intraeritrocíticos o intraeritroblásticos en un frotis sanguíneo.

Las personas con las condiciones de talasemia mayor o intermedia sufren de un estado hipercoagulable crónico. Se ha determinado una mayor frecuencia de estos problemas en aquellos individuos esplenectomizados, siendo importante la enfermedad arterial pulmonar. El tromboembolismo (TE) incluye trombosis venosa profunda, trombosis venosa portal y embolismo pulmonar; mientras que en vasos arteriales produce infarto isquémico. La incidencia de TE es más frecuente en la talasemia intermedia (3,9-29%) que en la condición mayor (0,9-4%).

Los factores asociados a esta hipercoagulabilidad son:

- Incremento en la activación plaquetaria producto de elevación de tromboxano A_2 y la prostacilina.
- Exposición en los eritrocitos de fosfatidilserina.
- Activación endotelial: aumento de marcadores como VCAM-1 e ICAM-1 y disminución del óxido nítrico.
- Esplenectomía: induce trombocitosis y mayor actividad plaquetaria.

En general, los hallazgos de laboratorio de la forma mayor son:

- Morfología de hemólisis severa: eritroblastosis, codocitosis e hipocromía marcada.
- Anemia severa: menor a 5 g/dl de Hb.
- Electroforesis: patrón $F-A_2$ o $F-A-A_2$.
- Prueba de estabilidad positiva y presencia de cuerpos de inclusión.

En Costa Rica se han encontrado más de 10 casos de Enfermedad de Cooley. El primero se reportó en 1975 con dos posibles genotipos, β^0/β^+ o β^+/β^+ -talasemia. En 1981 se reportó el segundo hallazgo, también con genotipos compatibles como los del caso anterior. En ambas comunicaciones se hizo evidente la presencia de al menos un alelo β^+ -tal, por la existencia de HbA en el hemoglobinograma. En el tercer reporte sobre β -tal mayor o intermedia, se logró demostrar un genotipo $\beta^0(\delta\beta)^0$, con una repercusión clínica atenuada del trastorno, en virtud de la moderada compensación dada por los niveles incrementados de la Hb fetal, a pesar de la ausencia de HbA. En 1989 se mencionó la cuarta enfermedad talasémica mayor de tipo β^0/β^0 -tal, con total ausencia de HbA y, como era de esperarse, con severa repercusión clínica, constituyéndose en el primer caso nacional donde concurren dos alelos β talasémicos de carácter supresor (β^0 -tal). En 1990 se descubrió otro caso más de carácter severo, β^0/β^0 , en una niña de tres años de edad, caucásica. En estos casos se determinó la mutación sin sentido en el codón β 39.

Talasemia intermedia

Se utiliza el término de talasemia intermedia (TI) para describir los hallazgos clínicos y hematológicos de pacientes cuya patología no es tan severa como la que caracteriza al estado homocigoto de la β -tal, pero sí más importante que la que corresponde al estado heterocigoto o rasgo. La TI es un término descriptivo de un cuadro clínico concreto, pero con una etiología variable (Cuadro N° 6). Se le puede definir como una forma de talasemia que, si bien cursa con anemia, ictericia, esplenomegalia y hepatomegalia, por lo general no presenta requerimientos transfusionales. A pesar de esta definición, los pacientes con TI pueden necesitar transfusiones de sangre cuando la anemia, habitualmente bien tolerada, se agrava debido a un proceso externo. Como se explicó, en esta se ha descrito un mayor riesgo a tromboembolismo.

Cuadro N° 6. Formas de β talasemia	
1. Formas homocigotas o heterocigotas compuestas	
1.a.	Herencia de alelos β tal leves (β tal silenciosos o β^{++}). El fenotipo depende de los genes β implicados.
1.b.	Herencia conjunta de α tal. El fenotipo depende del desbalance entre la razón de globina α /no α .
1.c.	Incremento en los niveles de Hb Fetal: polimorfismo <i>Xmn1</i> -Gy, mutaciones en región promotora del gen β , factores estimuladores de HbF en posición trans.
2. Estado heterocigoto de β talasemia	
2.a.	Co-herencia de genes extra α ($\alpha\alpha\alpha/\alpha\alpha$, $\alpha\alpha\alpha/\alpha\alpha\alpha$, $\alpha\alpha\alpha\alpha/\alpha\alpha$, $\alpha\alpha\alpha\alpha/\alpha\alpha\alpha\alpha$).
2.b.	Formas dominantes de β talasemia: variantes inestables de cadenas β .
2.c.	Delección somática del otro locus β : mosaicismo.
3. Heterocigotos compuestos con variantes de cadena β: HbE/ β tal.	
4. Doble heterocigotos para β talasemia y PHHbF o $\delta\beta$ talasemia.	

El cuadro clínico de la TI es el resultado de las interacciones entre múltiples genes talasémicos o entre estos y los distintos genes de hemoglobinas anormales. Entre un 60% y un 90% de los casos son producto de la herencia de dos alelos β tal, y la reducida severidad clínica se debe a la herencia de los alelos benignos que permiten la producción significativa de cadenas β . El curso clínico es el de una anemia crónica bien compensada y tolerada, que puede exacerbarse durante períodos de infección, déficit de folatos, hiperesplenismo o embarazo. El hiperesplenismo es frecuente y en ocasiones se hace necesaria la esplenectomía, cuando el cuadro periférico de citopenias es importante y hay un aumento en la frecuencia de los requerimientos transfusionales. La supervivencia de los eritrocitos en los pacientes con TI está acortada.

En cuanto a los hallazgos de laboratorio para la talasemia intermedia se encuentra:

- Morfología variante entre una talasemia menor y una mayor. Dependiendo del caso se pueden observar algunos eritroblastos.
- Anemia con hemoglobina mayor a 5 g/dl.
- Electroforesis: varía entre formas semejantes a una talasemia menor y patrones tipo F-A-A₂.
- La prueba de estabilidad puede ser positiva y pueden observarse o no escasos cuerpos de inclusión.

Opciones terapéuticas en la talasemia mayor

Los niños con la forma homocigota severa son dependientes vitalicios de transfusiones sanguíneas, por su incapacidad de sintetizar HbA. Una opción de tratamiento es el trasplante medular o de células madre, por su potencial curativo. El primer trasplante medular exitoso en talasemia mayor se remonta a inicios de los años 1980. Hasta el momento, se han efectuado cerca de 3.000 trasplantes de células madre en individuos con la forma homocigota. Con una adecuada quelación, se ha logrado una sobrevida libre de la enfermedad (a los 5 años) del 80-90% en talasémicos sin hepatomegalia ni daño hepático. En condiciones más adversas, la efectividad del trasplante de médula ósea decae a más del 50%. El trasplante de células madre evita el daño de hemocromatosis, al eliminarse la dependencia de transfusiones. Sin embargo, se mantienen complicaciones como: infecciones, endocrinopatías, defectos cardiovasculares, retardo del crecimiento, cardiopatía, entre otros.

En la actualidad, el uso de fármacos con capacidad de quelar el hierro ha mejorado notablemente la sobrevida de estos pacientes, al disminuir el daño de este mineral a los tejidos. Se ha utilizado con éxito la deferoxamina, y en los últimos años se han desarrollado quelantes orales como el deferasiro. En algunos protocolos se han empleado pequeñas dosis de ácido ascórbico, que incrementa la quelación del hierro por la deferoxamina.

Estudios clínicos han buscado aumentar los niveles de Hb fetal, basándose en la evidencia de que los cuadros de talasemia mayor no se desarrollan hasta la inactivación de los genes γ . En esta línea, se han probado tres clases de potenciales agentes terapéuticos: agentes quimioterapéuticos (hidroxiurea), derivados de ácidos grasos de cadena corta (derivados del butirato o inhibidores en la deacetilasa de histonas) y eritropoyetina (EPO).

En el caso de la EPO u ácidos grasos de cadena corta, su efecto consiste en prolongar la supervivencia eritroide, optimizar la proliferación y reducir la apoptosis. Los inhibidores de la deacetilasa de histonas activan de manera directa la región promotora del gen $\text{A}\gamma$ globina. Los agentes hipometilantes inducen la actividad de regiones promotoras del gen de γ globina.

Independientemente del mecanismo, estas investigaciones lo que buscan es un efecto funcional final de eliminar o reducir de forma significativa las necesidades obligatorias de derivados sanguíneos.

La terapia génica solo se ha trabajado a nivel de animales de laboratorio y uno de los principales problemas es la selección de un vector adecuado y seguro.

SÍNDROMES DE ALFA TALASEMIA

A diferencia de las beta-tal, las alfa-tal se producen, por lo general, por pérdidas de genes. Estos síndromes van desde la forma silenciosa, totalmente asintomática (α^+ -tal), hasta el tipo incompatible con la vida, como lo es el *hydrops fetalis* por Hb Bart, frecuente en Asia, en el cual no hay síntesis absoluta de cadenas α .

Los loci de genes de globina alfa humana se hallan duplicados y ambos están estrechamente ligados en el brazo corto del cromosoma 16. En una célula diploide, el genotipo normal para globina alfa se representa, por lo tanto, como $\alpha\alpha/\alpha\alpha$. Recientes estudios han demostrado que en población asiática como negra, la pérdida de genes es la causa más común de α^0 tal, por lo que los diferentes cuadros de esta patología son el resultado de la pérdida de uno o más genes.

Se han descrito diversas alteraciones genéticas que pueden detectarse mediante la reacción en cadena de la polimerasa, algunos de los más frecuentes son las deleciones: -MED, -SEA, -FIL, -20,5 kb, -3,7 kb y la -4,2 kb. Estos defectos se asocian a cuadros α^0 o α^+ y su frecuencia es mayor en determinados grupos étnicos.

A nivel fenotípico, las α -tal pueden ser reconocidas por varios desórdenes clínicos. Ellos son el síndrome

de Hb Bart (*hydrops fetalis*), la enfermedad por HbH (varias veces reportada en nuestro país), y dos diferentes estados portadores: la α -tal2 o α^+ -tal, que corresponde a la forma silenciosa o benigna, y la α -tal 1 o α^0 -tal o cuadro menor (Cuadro N° 7).

En la actualidad ha quedado claro que no todos los síndromes de α -tal son por delección genética total, pues se han reportado cuadros de enfermedad por HbH y de *hydrops fetalis* por genes disfuncionales o que han sufrido delección parcial. En ciertas poblaciones existe otro determinante genético de α -tal, dado por Hbs anormales de cadena alfa elongada por mutación del gen α en su posición terminal (Constant Spring, Icaria, Koya Dora, Seal Rock). Todos los defectos moleculares que llevan a α^0 tal pueden también incluir a los genes embrionarios ζ , y si el trastorno se tratara de una condición homocigota, no sería posible la síntesis de ninguna Hb embrionaria (Gower y Portland), lo cual haría incompatible la vida fetal temprana.

La Hb Bart gamma 4 (γ_4) generalmente se asocia con el periodo neonatal, con presencia de α -tal, y puede demostrarse sin dificultad en sistemas electroforéticos a pH alcalino, por métodos inmunológicos, por microcromatografía en CM-celulosa y por electroforesis de globina. Los métodos de biosíntesis de globina también ponen de manifiesto el desequilibrio sintético entre cadenas alfa y no alfa en sangre de neonatos, con el consiguiente diagnóstico de α -tal. En el nacimiento, las cantidades de esta Hb pueden ser de 1-2%, 5-6% y de 20-40%; estos valores corresponden, respectivamente, a los determinantes genéticos α^0 -tal (- α/α o - α/α) y la combinación de ambos, y a la enfermedad para HbH (- α/α). Al menos esta ha sido la experiencia en tailandeses.

La α -tal ocurre en muchos grupos étnicos y es sobre todo común en chinos, en el sudeste asiático y en África Occidental, así como en el Mediano Este y en el área mediterránea. En asiáticos, los haplotipos de α -tal que predominan son el - α/α o α^0 y el clásico - α/α o α^+ -tal, cuya concurrencia alélica origina la enfermedad por HbH. En raza negra el genotipo predominante es el α^+ , α -tal 2 o - α/α . Es menos frecuente el fenotipo α^0 -tal, el cual, por otra parte, es genotípicamente producto de la herencia dual de α^+ , por lo que el genoma diploide del carácter determinante de α^0 -tal corresponde en esa raza al genotipo - α/α y no al - α/α de los asiáticos. De tal forma, en raza negra el rasgo de α -tal (α^0) se debe fundamentalmente a la homocigosidad para el gen α^+ -tal, lo que explica el hecho de que la enfermedad por HbH (- α/α) y la α^0 -tal homocigota (- α/α) no existan en dicha raza. Esto quiere decir que la α -tal usual en raza negra es producto de los alelos α^+ , ya sea en estado heterocigoto u homocigoto.

Debe destacarse que el estado heterocigoto α^0 de los asiáticos y el homocigoto α^0 de raza negra presentan idéntico fenotipo (microcitosis hipocrómica, con HbA₂ disminuida). Se reconoce que el hallazgo de la Hb Bart en el nacimiento en individuos de raza negra es un

buen indicador de α -tal, al menos del gen α^0 . En esta raza se ha encontrado una frecuencia de dicha Hb del 23,2%, con una cifra aproximada de 3% para el gen α^0 tal (condición homocigota de α^+) y de 20% para el gen silencioso o α^+ -tal.

Cuadro N° 7. Clasificación general de las alfa talasemias

A. Determinantes genéticos			
Designación	Haplotipo	Estado heterocigota	Estado homocigota
- Normal - α^0 tal 1 (α^0)	$\alpha\alpha$ - - /	α^0 tal; 5-10% Hb Bart al nacimiento, VCM y HCM bajos. Raro en raza negra; frecuente en asiáticos.	<i>Hydrops fetalis</i> (síndromes de Hb Bart).
- α tal disfuncional o por pérdida parcial de genes α	- α^0 /	Hallazgos hematológicos similares al $\alpha\alpha$ /--. Prevalente en turcos, shiitas.	El producto puede no ser viable.
- α tal 2 (α^+)	- α /	α^+ tal; 0-2% Hb Bart al nacimiento. Cambios hematológicos mínimos o nulos. Muy frecuente en raza negra (25%).	Como el del heterocigoto α tal 1 (α^0). Frecuente en raza negra (2-4%).
- α tal no por delección	$\alpha\alpha$ /	Hallazgos similiares al α^+ , pero los cambios hematológicos pueden ser más severos. Prevalente en chinos y saudíes.	Enfermedad por Hb en algunos casos.
- Hb Constant Spring; 142 gln (*)	UAA->CAA	0-2% Hb Bart al nacimiento, 0,5-1% HbCS.	Fenotipo más severo que el heterocigoto α^+ tal 1; 5-6% de HbCS.
B. Interacciones genéticas			
Interacción	Genotipo	Desorden	
α^0 tal/ α^+ tal	- - / - α	Enfermedad por HbH.	
α^0 tal/ α tal no por delección	- - / $\alpha\alpha$	Enfermedad por HbH.	
α tal no por delección/ α tal	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	Enfermedad por HbH, no por delección.	
α tal disfuncional/ α^+ tal	- α^0 / - α	Enfermedad por HbH.	
α^0 tal/HbCS	- - / $\alpha\alpha$ CS	Enfermedad por HbH.	
α^0 tal/HbQ, HbG, Hb Hasharon	- - / - α Q; G; Hasharon	Enfermedad por HbH y HbQ, HbG o Hasharon.	

(*) Otros similares en la condición heterocigota: Hb Koya Dora (142 ser), Hb Icaria (142 Lis), Hb Seal Roack (142 glu).

La enfermedad por hemoglobina HbH

Es una enfermedad α -talasémica (α -tal) asociada con la presencia de una Hb inestable con alta afinidad por el oxígeno (HbH), la cual tiene la estructura de un tetramero de cuatro cadenas polipeptídicas beta y grupos heme asociados.

Es muy frecuente en el Sudeste de Asia, en el Medio Este, Grecia, Cerdeña y Chipre; es prácticamente inexistente en raza negra y se encuentran casos esporádicos en países con población inmigrante de regiones con gran incidencia del problema, como es el caso de Costa Rica y otros países de América.

La enfermedad por HbH es clínicamente la forma más importante de α -tal, y fue el primer síndrome de α -tal descrito en 1955, en sujetos griegos. Se caracteriza por la anemia hemolítica crónica de expresividad clínica variable, aunque por lo general es de talasemia intermedia, con niveles de Hb entre 7 y 10 g/dl, con moderada reticulocitosis (5-10%); morfológicamente es microcítica hipocrómica, con poiquilocitosis y codocitos. Presenta cuerpos de inclusión característicos, tipo "bola de golf", que se ponen en evidencia con colorantes supravitales. Otras características son los niveles bajos de HbA₂ y la presencia de una hemoglobina anormal (HbH) de gran movilidad electroforética, en una proporción que oscila entre el 5% y el 30% del total, y que en muchos casos va acompañada de cantidades pequeñas de Hb Bart. Por lo general, hay esplenomegalia evidente, y es común la hepatomegalia. La anemia suele hacerse más severa durante el embarazo, las infecciones y luego de la oxidación y precipitación de la HbH por agentes oxidantes, ya que es una Hb inestable.

Al contrario de lo que sucede con los síndromes importantes de β -tal, los enfermos con HbH no presentan el cuadro clínico de una hemocromatosis secundaria, e incluso, se puede observar un déficit compatible con la reducción de los depósitos férricos. Se ha sugerido que la pérdida de hierro por la orina podría explicar esa situación. Por otro lado, se ha visto que cuando existe un déficit de hierro, la HbH decrece a tal punto que puede no ser detectada, pero los valores iniciales se restablecen luego de la terapia férrica. Por eso, es la forma de α -tal más fácil de identificar por métodos bioquímicos.

Diagnóstico de las α talasemia

Es claro que en la actualidad y en ciertos centros especializados, es posible realizar el diagnóstico en el propio período intrauterino, con base en estudios de síntesis de globina, como también por el mapeo

de genes a partir del ADN del núcleo de fibroblastos fetales o la detección de los alelos afectados por la técnica del PCR. En el prematuro y en el nacido a término se puede catalogar el fenotipo alfa talasémico de acuerdo con los valores de la Hb Bart (gamma 4), al menos en la población oriental, pues en raza negra no existe una buena correlación entre α^+ tal y el hallazgo de Hb Bart. En el nacimiento los tailandeses han señalado los siguientes valores de esa Hb tetramérica:

- Para el fenotipo α^+ tal ($-\alpha/\alpha$) = 1-2%.
- Para el fenotipo α^0 tal ($-\alpha/\alpha$) = 5-8%.
- Para el fenotipo enfermedad por HbH ($-\alpha/-$) = 20-40%.
- Para la enfermedad doble homocigótica (*hydrops fetalis*) = 95% Bart; resto Hb Portland.

Nuestra experiencia sobre diagnóstico de alfa talasemia en recién nacidos caucásicos, mestizos y de raza negra, ha aportado resultados comparables con lo reportado en la literatura, inclusive en lo relacionado con la alta frecuencia del fenotipo α^+ tal en raza negra. El hemograma y la bioquímica hematológica (electroforesis, cuerpos de inclusión, etc.) son totalmente normales en el fenotipo silencioso o α^+ tal. Hay estigma talasémico (microcitosis, hipocromía, codocitos, F.O. disminuida, Hto y Hb ligeramente bajos) en el heterocigoto α^0 tal. Con paciencia, es posible demostrar también escasos cuerpos de inclusión de HbH en esta variedad y tal vez trazas de HbH en gel de almidón. Cuando se trata de la enfermedad por HbH (genotipo $\alpha^0\alpha^+$), el cuadro es muy característico de una talasemia intermedia, con anemia microcítica hipocrómica, codocitosis, esferocitosis y marcada poiquilocitosis con células en lágrima. La prueba para cuerpos de inclusión (HbH) es muy evidente, así como de un 2-30% de HbH por electroforesis, en unión de una prueba de estabilidad con isopropanol positiva; asimismo, es evidente la prueba de solubilidad si la HbH está en concentración mayor de 20%. Esta prueba no se solubiliza con urea (a diferencia de la HbS). Se ha reportado también un caso de HbH con genotipo -3,7/-SEA en el Hospital Nacional de Niños.

La F.O. al 0,36% es positiva en la forma α^0 tal. En general, es importante mencionar que en la enfermedad por HbH es infrecuente que el paciente entre en deficiencia por hierro por pérdida urinaria.

Por otra parte, cabe señalar que en la calificación de los padecimientos mayores de α tal es imprescindible el estudio familiar, a fin de establecer la dispersión, el consejo y la educación genética.

En Costa Rica se han detectado más de 10 casos de enfermedad por HbH. Además, se ha comprobado la

ligazón genética de α tal y drepanocitosis. En esta nación también se describieron unas formas raras de talasemia alfa asociadas a cuadros de retardo mental. A la vez, se postuló que el defecto en el locus alfa puede ser adquirido a través de la línea germinal paterna y se detectó una translocación no balanceada

a nivel del cromosoma 16. Asimismo, se describió otra alteración ligada al cromosoma X.

En el Cuadro N° 8 se resumen algunos aspectos hematológicos de las talasemias menores o intermedias estudiadas en dicho país.

Cuadro N° 8. Datos hematológicos típicos en talasemia heterocigotas				
Tipo	Hb (d/dl)	VCM (fl)	HCM (pg)	Electroforesis de hemoglobina
Rasgo α -tal (-/- $\alpha\alpha$)	12,7 $\pm$ 1,1	72,2 $\pm$ 3,3	23,2 $\pm$ 1,3	HbA ₂ normal o $\downarrow$ HbFnl
Enfermedad HbH (-/- α)	8,5 $\pm$ 1,5	64 $\pm$ 4	20 $\pm$ 2,2	HbA ₂ , y HbFnls, H (3-30%)
Rasgo de β -tal	11,2 $\pm$ 1,0	64,7 $\pm$ 4,4	20,3 $\pm$ 2,2	HbA ₂ aumentada
Rasgo de F tal	11,5 $\pm$ 1,2	67,2 $\pm$ 4,3	20,3 $\pm$ 2,3	HbA ₂ normal o $\downarrow$ HbF (5,18%)
Normal	14,7 $\pm$ 1,3	88,7 $\pm$ 5,3	28,8 $\pm$ 2,9	Normal

$\delta\beta$ TALASEMIA Y PERSISTENCIA HEREDITARIA DE Hb FETAL

Las $\delta\beta$ tal y la persistencia hereditaria de la Hb fetal (PHHbF) se caracterizan por una reducción concomitante de globinas $\delta\beta$, con un incremento de HbF. Los portadores de PHHbF poseen índices eritrocitarios normales, síntesis balanceada de genes α /no α y valores de HbF > 25%. Las $\delta\beta$ -tal son microcíticas-hipocrómicas, con desbalance globínico y HbF entre 10-15%. Al estar deprimida la síntesis de cadenas delta, en esta talasemia los valores de HbA₂ se encuentran dentro de los límites normales.

Las $\delta\beta$ son menos frecuentes que las β -tal y suelen resultar de delecciones de genes δ y β . Clínicamente, las $\delta\beta$ tal se caracterizan por cuadros más benignos tanto en la condición heterocigota como en la homocigota.

Además, se ha descrito una variante estructural llamada Hb Lepore, que presenta una fusión de cadenas $\delta\beta$. Esta es una hemoglobina anormal, con fenotipo talasémico, que se produce de la combinación de una cadena alfa normal, con una cadena no alfa compuesta por la unión entre el residuo N terminal de la globina δ y el extremo C terminal de la cadena β .

La PHHbF se produce por delecciones o por errores de alineación durante el entrecruzamiento de los genes β y δ , resultando en la producción de gen de fusión $\delta\beta$ (delta/beta). Esta condición produce un cuadro similar a la $\delta\beta$ tal, excepto que en la PHHbF

la síntesis de la cadena beta afectada se encuentra compensada en prácticamente todos los casos por una persistente producción de las cadenas gamma. Los casos de PHHbF deleccionales se producen por pérdidas de unas 70 kb en las dos variantes africanas y una menor en la variante India. En las PHHbF clásicas se encuentran valores muy elevados de HbF con distribución homogénea. Existen también determinantes no deleccionales y raras formas de PHHbF que cursan con bajos niveles de HbF, distribuida en forma heterocelular.

α talasemia y hemoglobina E

Los heterocigotos compuestos son muy comunes en regiones como Tailandia, Laos, Vietnam y, en general, en el sudeste asiático. Estos pacientes sufren de anemias que varían entre moderadas y severas y requieren transfusiones regulares. Debido a los flujos migratorios, esta condición ha aumentado su prevalencia en diversas zonas de los Estados Unidos.

Hemoglobinas talasémicas

Se menciona la presencia de algunas variantes de Hb que además de poseer una anomalía estructural, tienen alteraciones en la síntesis y presentan un fenotipo talasémico. Las más importantes son:

- HbE, por su alta frecuencia en zonas asiáticas. Esta posee una mutación $\beta^{26}\text{-glu-lis}$. En los sujetos homocigotos se presenta una microcitosis hipocrómica.

- b. Hb Lepore, que es una variante de fusión de globinas ($\alpha_2\delta\beta$). Se sintetiza en poca cantidad (normalmente entre 5% y 15% de la Hb). Los pacientes con esta variante presentan un fenotipo de talasemia menor.
- c. Hb Constant Spring es una variante de cadenas α con cadenas elongadas de globina.

Thein SL. Pathophysiology of beta thalassemia - a guide to molecular therapies. *Hematology* 2005; 1: 31-37.

Weatherall DJ, Clegg JB. The thalassaemia syndromes. 4 ed. Inglaterra: Blackwell Science; 2001.

BIBLIOGRAFIA

Cartín W, Valverde K, Suárez C, López J. Enfermedad por hemoglobina H; primer caso de la variante de hemoglobina H tipo (- α 3.7/ --SEA) en Costa Rica. *Acta Med Costarric* 2010; 52(3): 177-179.

Cunningham M, Mackin E, Neufeld J, Cohen AR. Complications of beta-thalassemia major in North America. *Blood* 2004; 104(1): 34-39.

Galanello R, Origa R. Beta-thalassemia. *Orphanet J Rare Dis* 2010; 5: 1.

Giarnida P, Rivella S. En: Hoffman R (editor). *Hematology basic principles and practice*. 6 ed. Canadá: Elsevier; 2013. p. 505-535.

Harteveld C, Higgs D. α -thalassemia. *Orphanet J Rare Dis* 2010; 5: 13.

Higgs DR. Gene regulation in hematopoiesis. New lessons from thalassemia. *Hematology* 2004; 1-13.

La Nasa G, Caocci G, Efficace F, Dessì C, Vacca A, Piras E, *et al.* Long term health-related quality of life evaluated more than 20 years after hematopoietic stem cell transplantation for thalassemia. *Blood* 2013; 122: 2262-2270.

Malik P, Arumugam P. Gene therapy for β thalassemia. *Hematology* 2005; 1: 45-50.

Marengo-Rowe AJ. The thalassemias and related disorders. *Proc Bayl Univ Med Cent* 2007; 20: 27-31.

Pennsylvania State University. Database Hb variants and thalassemia. Globin gene server. [Versión en Internet]. 2014. Consultada el 10 enero del 2104, en: <http://globin.cse.psu.edu/>

Ribeil JA, Arlet JB, Dussioot M, Cruz I, Courtois G, Hermine O. Ineffective erythropoiesis in β -thalassemia. *Scient World J* 2013; 394295.

Sáenz GF, Rodríguez WE. Síndromes talasémicos. Nuevos conceptos y estado actual del conocimiento en Costa Rica. *Acta Méd Costarric* 2006; 48(4): 172-178.

Sirachainan N. Thalassemia and hypercoagulable state. *Thromb Res* 2013; 132(6): 637-641.

Rund DP, Rachmilewitz E. β -thalassemia. *N Eng J Med* 2005; 353: 1135-4116.

LEUCOCITOS: PRODUCCIÓN, CINÉTICA Y FUNCIÓN

Dr. Rafael Jiménez Bonilla
 Dra. Lidiette Salazar Palma
 Dra. Berta Valverde Rojas
 Dr. Walter Cartín Sánchez

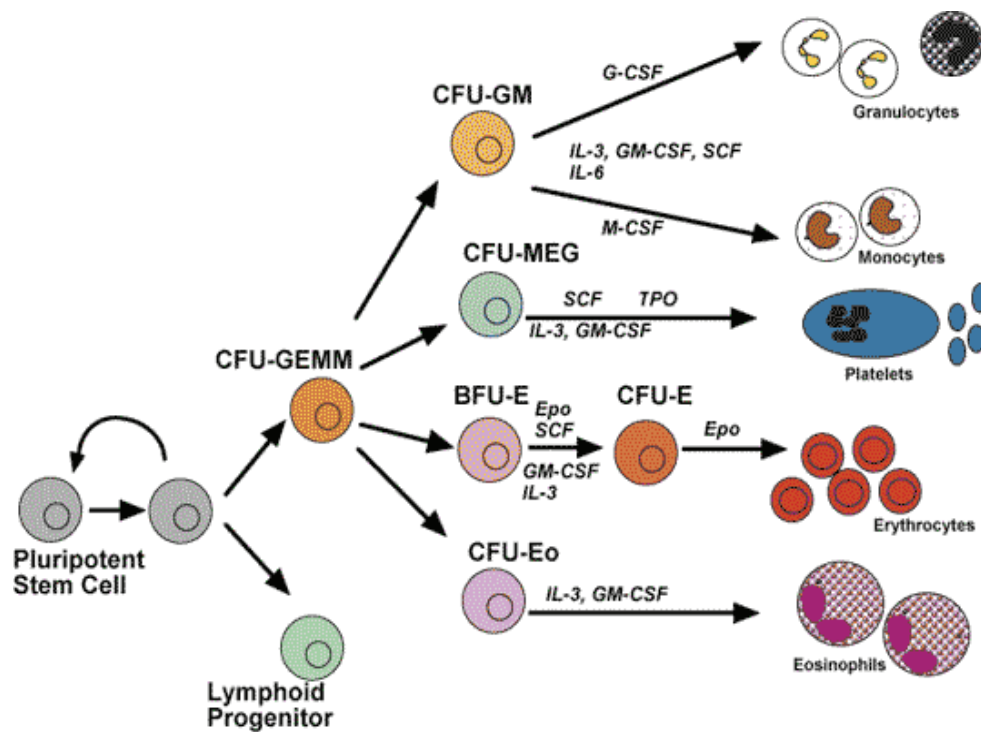
GENERALIDADES

Leucopoyesis

Todas las células sanguíneas se derivan de precursores pluripotenciales germinativos llamados células madre, tronco común o *stem cells*. La más primitiva de ellas es la unidad formadora de colonias linfoide-mieloide

(UFC-LM) o célula inmuohematopoyética. De ella se originan todas las células sanguíneas.

Las células madre pueden obtenerse de médula ósea (MO), de leucocitos periféricos, de músculo y de cordón umbilical, y poseen gran capacidad para diferenciarse en las distintas líneas celulares hematológicas y también en células de otros tejidos, como se ha visto desde hace algún tiempo.



CFU: unidad formadora de colonias. **G:** granulocítica, **M:** monocítica, **E:** eritroide, **Eo:** eosinófila, **MEG:** megacariocítica.

Figura N° 1. Secuencia de la hematopoyesis y su diferenciación en líneas celulares.

SERIE GRANULOCÍTICA

La producción de granulocitos es de gran magnitud y estos son reemplazados en su totalidad unas 2,5

veces al día. De tal forma, se estima que diariamente se producen unos 167×10^7 neutrófilos/kg. La producción normal se hace en la médula ósea (MO) y los elementos pasan por tres fases:

1. *La fase medular*, donde maduran. Esta presenta tres compartimentos: el de reserva, que comprende 900 g, formado por células madre y mieloblastos (M1); el *pool* mitótico (M2, M3 y M4); y el *pool* madurativo (M5, M6 y M7), después del cual solo hay maduración. Los M2 son los progranulocitos, los M3 y M4 los mielocitos, los M5 los metamielocitos, los M6 las células en bandas y los M7 los segmentados.
2. *La fase en sangre periférica*, donde están de paso. Es de aproximadamente 10 g. En ella existe una fracción circulante y otra adherida a las paredes de los vasos, que normalmente no circula. Cada una forma el 50% de los granulocitos periféricos.
3. *La fase tisular* (en los tejidos), donde los segmentados realizan y completan su principal función. Comprende cerca de 600 g.

Envejecimiento y muerte

Los granulocitos desaparecen al azar de la sangre periférica y su permanencia en ella es de siete horas y media. La vida media de los granulocitos contrasta mucho con los 120 días del eritrocito. Esto se debe a que la función primordial de los granulocitos es en los tejidos.

La desaparición exponencial de los granulocitos es tan rápida que no parece ser modificada por el envejecimiento. La gran mayoría de ellos se pierde a través del tracto gastrointestinal. Sin embargo, también pasan de los vasos sanguíneos a los tejidos, atraídos por sustancias quimiotácticas, y ahí mueren rápidamente. La muerte puede ocurrir por fragmentación o al ser fagocitados por los macrófagos. Solo un número pequeño de ellos muere en sangre periférica.

En raras ocasiones pueden verse granulocitos fagocitados por macrófagos en MO, fenómeno que se incrementa en infecciones severas y en problemas inmunes.

Maduración

Este es un proceso continuo en el que se caracterizan siete estadios (M1 a M7), de acuerdo a la naturaleza de los gránulos y las características del núcleo. Lo anterior es válido para estados normales, pero en situaciones de estrés o en estados patológicos, se producen asincronismos madurativos de las organelas que hacen que la clasificación morfológica se torne imprecisa. En esos casos, para definir el estadio, deberá seguirse la maduración del núcleo y no la del citoplasma.

Los gránulos azurófilos que se observan en los mieloblastos y en los progranulocitos nunca desaparecen, sino que se vuelven menos numerosos y pierden sus características tintoriales. A partir de los mielocitos, los gránulos se vuelven específicos y más pequeños, diferenciándose en tres tipos: basófilos, neutrófilos y eosinófilos.

Pasaje a la circulación

Los polimorfonucleares pasan de la MO a la circulación por diapédesis activa. De la misma forma pasan a los tejidos. Cuando los neutrófilos dejan la sangre nunca regresan a ella en número apreciable.

Clasificación

En 1904, Arneth ideó una clasificación de los granulocitos basada en el número de lóbulos del núcleo, debido a que este se lobula durante su desarrollo. De tal manera, el aspecto de los granulocitos constituye un índice de madurez. Arneth sugirió la expresión desviación a la izquierda, para indicar la presencia de células jóvenes (con núcleos mono y bilobulados) en la sangre circulante, y desviación a la derecha, para hacer referencia al aumento de células con núcleos muy lobulados.

Schilling simplificó esta clasificación y distinguió cuatro tipos: mielocitos, metamielocitos, células en banda y segmentados. Esta clasificación admite dos tipos de *desviación a la izquierda*, una *regenerativa*, acompañada de aumento del número total de neutrófilos, y otra *degenerativa*, que cursa con disminución de ellos por depresión de la MO. La clasificación de Schilling (Figura N° 2) incluye la fórmula diferencial de los granulocitos en porcentaje.

La *desviación a la derecha* tiene importancia diagnóstica en la anemia megaloblástica, y la *desviación a la izquierda* se presenta en infecciones severas y en intoxicaciones por diversas causas.

NEUTRÓFILOS

Función

La vida media del neutrófilo es de cinco días, de los cuales solo pasa siete horas y media en sangre periférica. Su principal función es la localización de microorganismos patógenos. Para esto realiza movimientos directos hacia el invasor (quimiotaxis), seguidos por fagocitosis del organismo y luego por la muerte o inhibición en la multiplicación de los microbios ingeridos.

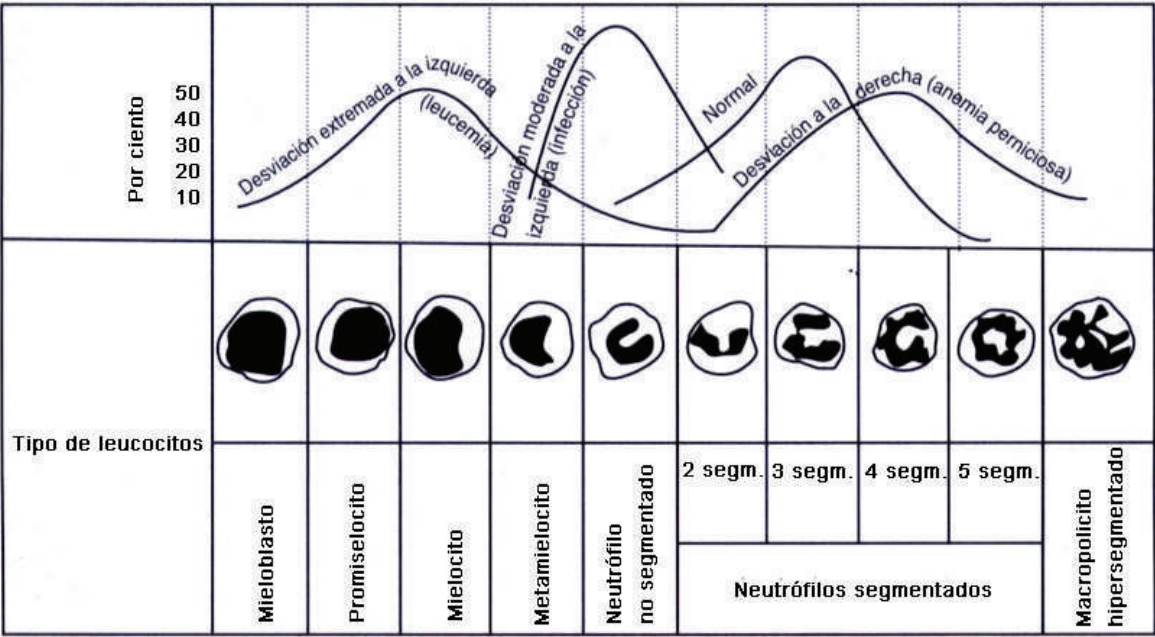


Figura N° 2. Curvas de desviación de los leucocitos, según Schilling.

La *quimiotaxis* se define como los movimientos celulares orientados, producidos por estímulos químicos. El leucocito normalmente se mueve al azar, pero al ser estimulado comienza a avanzar en línea recta, aunque su velocidad no aumenta. Los movimientos ameboides del leucocito son producto de las proteínas contráctiles parecidas a la actina y a la miosina. La temperatura altera la locomoción, pero no así un pH entre 6,5 y 7,5.

Las sustancias que promueven la actividad quimiotáctica son productos bacterianos, componentes leucocitarios, tejidos dañados y fracciones del complemento. Las anomalías de la quimiotaxis pueden presentarse por disfunción intrínseca del leucocito o por alteraciones del medio.

La *fagocitosis* está mediada por receptores, que incluso logran reconocer hasta subclases de inmunoglobulina G y componentes del complemento. El citoplasma se pone inicialmente en contacto con la partícula que se va a fagocitar, invaginándose y rodeándola por completo. De esta manera, se forma una vacuola fagocítica o fagosoma. Los gránulos del neutrófilo vierten su contenido enzimático dentro de la vacuola y se produce degranulación entre los 5 a 30 minutos después de la ingestión. La caída del pH dentro del fagosoma facilita la lisis.

La fagocitosis requiere energía, la cual se obtiene de la glicólisis. Además, necesita una osmolaridad óptima y receptores séricos que interactúen con la inmunoglobulina G y con el complemento, pero no para la muerte de la bacteria.

En el fagosoma se producen cambios bioquímicos que incluyen aumento de la glicólisis y de la vía de las hexosas monofosfatos, así como producción de superóxido (O_2^-) y de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) e incremento de lípidos y del recambio de ARN. El consumo de oxígeno aumenta de dos a tres veces, y esta *extra respiración* se produce fuera de las mitocondrias. La caída del pH en la vacuola se realiza dentro de los primeros 8-10 minutos y puede llegar a 4,0 y 4,5.

La *muerte microbiana* utiliza dos mecanismos, uno dependiente y otro no dependiente del oxígeno. En el dependiente de oxígeno, la actividad bacteriana se reduce en condiciones anaeróbicas, aunque la fagocitosis normal no se realiza en estas condiciones. En el caso de los mecanismos no oxidativos, estos incluyen la caída del pH dentro del fagosoma, lo cual impide que las células se repliquen. Además, pueden aislar leuquina. La lactoferrina, presente en los gránulos secundarios, es bacteriostática cuando no está totalmente saturada con hierro.

En la muerte oxidativa de los microorganismos se genera superóxido y H_2O_2 del NADPH reducido, se activan las oxidasas de la fosfopiridina y la vía de las hexosas, y se produce más H_2O_2 que interacciona con la mieloperoxidasa.

Anormalidades cuantitativas

Neutropenia (< 1.200 neutrófilos/ μ l)

La causa más frecuente de neutropenia son los problemas infecciosos, entre los que predominan la tifoidea, la brucelosis, infecciones virales (rubéola, sarampión, hepatitis y mononucleosis infecciosa), el tifo, la malaria, el kala-azar y la toxoplasmosis. Otras causas incluyen: mielopoyesis ineficaz en las anemias megaloblásticas, infiltración medular en las leucemias, falta de producción en la anemia aplásica o destrucción aumentada.

La neutropenia puede presentarse por anomalías congénitas o por defectos hereditarios. Por lo tanto, los mecanismos pueden ser inmunológicos, mecánicos o múltiples.

Neutrofilia (> 7.000 neutrófilos/ μ l)

El aumento en la cuenta absoluta puede presentarse por un incremento en la producción medular, tal como se ve en los síndromes mieloproliferativos. En el Cuadro N° 1 se observan algunas causas de neutrofilia.

Cuadro N° 1. Causas de neutrofilia
- <i>Estímulo físico</i>: frío, calor, ejercicio, convulsiones, quemaduras, vómitos y anorexia. - <i>Estímulo emocional</i>: miedo, pánico, ansiedad, júbilo, cólera y furor. - <i>Infecciones</i>: bacterianas, micóticas, espiroquetales, virales y parasitarias. - <i>Desórdenes inflamatorios</i>: fiebre reumática, artritis, nefritis, colitis y pancreatitis. - <i>Drogas, hormonas y toxinas</i>: endotoxina, corticosteroides, digitalis y venenos. - <i>Desórdenes metabólicos</i>: eclampsia, necrosis hepática, acidosis diabética y gota. - <i>Desórdenes hematológicos</i>: anemia megaloblástica en tratamiento, leucemia, desórdenes mieloproliferativos, hemorragia y anemias hemolíticas. - <i>Desórdenes hereditarios</i>: urticaria familiar al frío. - <i>Causas misceláneas</i>: lipidosis y focomelia.

Anormalidades funcionales

Los principales defectos funcionales son las anomalías en la quimiotaxis, en la fagocitosis y en la muerte microbiana. Cualquiera de ellos puede producirse por causas extrínsecas o intrínsecas, y clínicamente presentan susceptibilidad aumentada a

las infecciones.

Las causas son variadas, presentándose anomalías en el sistema del complemento o en las inmunoglobulinas, interacción con drogas o toxinas y problemas en la locomoción o en el metabolismo (Cuadro N° 2).

Cuadro N° 2. Defectos funcionales del neutrófilo por anomalías del medio externo
Deficiencia de opsoninas
Agammaglobulinemia Supresión inmunológica Mieloma múltiple Leucemia linfocítica crónica Drepanocitosis Bajo peso al nacer
Anormalidades del complemento
Deficiencia de C'3 Deficiencia de C'5
Drogas y toxinas
Adrenocorticosteroides Etanol Citotóxicos <i>Staphylococcus aureus</i> (proteína A) Toxina alfa estafilocócica

Cuadro N° 2. Defectos funcionales del neutrófilo por anormalidades del medio externo
Hiperosmolaridad
En la médula renal Diabetes (cetoacidosis)
Hipofosfatemia

Menos comunes, pero más interesantes desde el punto de vista fisiopatológico, son los defectos intrínsecos

de la actividad bacteriana de los neutrófilos (Cuadro N° 3).

Cuadro N° 3. Defectos bactericidas intrínsecos del neutrófilo
Producción anormal de H_2O_2 y de O_2^- Enfermedad de granulomatosa crónica. Deficiencia total de G6PD. Deficiencia de piruvato quinasa. Deficiencia de glutatión peroxidasa.
Otras deficiencias enzimáticas Deficiencia de mieloperoxidasa.
Defectos de degranulación Enfermedad de Chediak-Higashi.
Mecanismos desconocidos Leucemia mieloblástica aguda. Radiación craneoespinal. Infección masiva.

El problema más estudiado de todos estos es la *enfermedad granulomatosa crónica* de los niños, que cursa con susceptibilidad a las infecciones por un defecto en el metabolismo del oxígeno después de fagocitar. El consumo de O_2 , la generación de H_2O_2 y de O_2^- y la estimulación de la desviación de las hexosas están disminuidas. Todo el cuadro podría deberse a una anormalidad de la NADH oxidasa, de la NADPN oxidasa o de otras enzimas, lo que hace que el defecto sea heterogéneo.

Esta enfermedad es hereditaria y se transmite en forma recesiva ligada al sexo. Los cuadros clínicos son infecciones recurrentes de piel y pulmones, linfadenitis séptica, hepatoesplenomegalia y formación de granulomas. Algunas variantes se presentan en varones o unidas al cromosoma X, como es el Síndrome de Job en niñas pelirrojas.

El diagnóstico se sospecha por adenopatías muy grandes, que se convierten en granulomas y en abscesos asépticos sin pus. La edad de las primeras manifestaciones es variable y los pacientes no viven más de 10 años. La prueba de azul de tetrazolium

ayuda al diagnóstico, ya que da resultados muy bajos aun después de estímulo. En la biopsia rectal se observan histiocitos con un material característico en su interior. La deficiencia de mieloperoxidasa hace que la *Candida* y las bacterias ingeridas no mueran después de ser fagocitadas.

Otro problema intrínseco presente en unos pocos niños es el *síndrome del leucocito perezoso*, el cual cursa con infecciones a repetición, fiebre crónica y neutropenia severa con MO normal. En este cuadro existe quimiotaxis anormal y pobre respuesta neutrofílica inducida por estímulos inflamatorios.

Anormalidades morfológicas

Desde hace mucho tiempo se conocen diversas alteraciones morfológicas de tipo hereditario y adquirido, las cuales se describen brevemente a continuación.

Adquiridas

- *Dimorfismo sexual*: las mujeres normales presentan

usualmente una inclusión cromática llamada cuerpo de Barr o cromatina sexual en el núcleo de los segmentados. Estos cuerpos pueden verse en el 80-90 % de sus células somáticas. Esta inclusión se aprecia como un *palillo de tambor* y mide de 0,7-1,2 μ , observándose en el 1-5% de los granulocitos circulantes de las mujeres. Al menos seis células de 500 deben mostrarlo para determinar el sexo. La cromatina sexual permanece dentro del núcleo cuando este no se ha segmentado y se exterioriza al segmentarse.

- **Granulación tóxica:** refleja una anormalidad en la maduración, observándose gránulos azurófilos aun en avanzados estados de maduración. También puede deberse a agentes tóxicos que producen nuevos gránulos. Se cree que son gránulos primarios peroxidasa positivos que se tiñen fácilmente, aunque algunos piensan que son fagosomas o vacuolas autofágicas.

La granulación tóxica sugiere la presencia de una infección bacteriana generalizada, y si se observa en más del 50% de los neutrófilos sugiere pronóstico grave.

En las infecciones severas también puede haber *vacuolización o basofilia citoplasmática, áreas picnóticas en el núcleo y presencia de cuerpos de Döhle*.

- **Cuerpos de Döhle:** son áreas redondas u ovales que por lo general se observan en la periferia del citoplasma y se tiñen de azul tenue con los derivados del Romanowsky. Son agregados laminares de retículo endoplasmático rugoso y se asocian a infecciones, quemaduras severas, exposición a agentes tóxicos, leucemias granulocíticas y embarazo. Deben diferenciarse de los cuerpos de May-Hegglin, ya que ambos son muy parecidos.
- **Neutrófilos hipersegmentados:** en algunas familias, en forma hereditaria y con patrón autosómico dominante, se ha descrito más del 10% de los neutrófilos con cinco lóbulos o más. Su hallazgo en anemia megaloblástica es importante, porque son el primer cambio que se produce en ella, encontrándose neutrófilos de hasta 6 a 10 lóbulos. Si se observa un 3% de neutrófilos con más de cinco lóbulos o un 1% con más de seis glóbulos, puede establecerse el diagnóstico de hipersegmentación.
- **Neutrófilos gigantes:** se denominan macropolicitos y tienen un diámetro de 16 μ (promedio de 10-12 μ). Ocasionalmente, se ven en individuos sanos (1-3%), presentándose en el 5% de los sujetos

con infecciones o intoxicaciones asociadas a leucocitosis neutrofilica y presencia de mielocitos en sangre periférica. También se observan en anemias megaloblásticas y en pacientes que se recuperan de una pancitopenia causada por agentes citotóxicos. Su mecanismo de formación es desconocido.

- **Erlichiosis:** puede presentarse con inclusiones, tanto dentro de los monocitos como de los segmentados neutrófilos. Actualmente, los hematólogos pueden hacer diagnóstico presuntivo en pacientes con fiebre de origen oscuro. Sin embargo, debe ser confirmada con estudios de biología molecular.

Hereditarias

- **Anomalía de May-Hegglin:** es rara y presenta inclusiones citoplasmáticas grandes, basófilas y piraninofílicas. Se acompaña de trombocitopenia variable, leucopenia y plaquetas gigantes. En algunos pacientes se encuentra sangrado anormal por defecto cualitativo de las plaquetas y por trombocitopenia. Las inclusiones son similares a los cuerpos de Döhle, pero más grandes (2 a 5 μ) y redondas, con más de una por célula.
- **Anomalías de Pelger-Huët:** es benigna, heredada en forma autosómica dominante. El núcleo de los leucocitos se observa en forma de riñón o herradura, prácticamente sin segmentarse. La cromatina es muy densa. La función fagocítica y bactericida son normales y, aunque la migración hacia los tejidos es defectuosa, no presenta problemas clínicos.

En mononucleosis infecciosa, algunas infecciones crónicas y con el uso de ciertas drogas, pueden observarse fenómenos parecidos que se denominan *pseudo Pelger-Huët*. En estos casos, los padres del paciente no presentan la alteración. Lo importante de esta anomalía es diferenciarla de la desviación a la izquierda.

- **Anomalía de Alder-Reilly:** presenta gránulos grandes azurófilos o basófilos que pueden confundirse con granulación tóxica. Se observa en casos donde existe degradación incompleta de los mucopolisacáridos.

En el gorgolismo también se observa esta anormalidad, pero en estos casos hay retardo mental, engrosamiento de la lengua, opacidad córnea y hepatoesplenomegalia.

- **Anomalías de Chediak-Higashi:** es autosómica recesiva y presenta albinismo óculo-cutáneo y del

pelo, fotofobia, susceptibilidad a las infecciones piógenas, hepatoesplenomegalia, pancitopenia y presencia de organelas parecidas a lisosomas en el citoplasma de los leucocitos de sangre periférica y MO. Morfológicamente son gránulos grandes color púrpura.

Esta anomalía es mortal en los homocigotos, quienes suelen presentar consanguinidad familiar. Los heterocigotos cursan con gránulos en los leucocitos, pero no tienen problemas clínicos severos. Se han descrito cuatro alteraciones claras: defecto en la quimiotaxis, retraso en la destrucción de bacterias fagocitadas, lisosomas anormales y disminución de los granulocitos circulantes. Lo anterior conlleva a un aumento de la susceptibilidad a las infecciones, lo cual unido a las hemorragias por trombocitopenia y el mal funcionamiento plaquetario, constituye la principal causa por la que el paciente muere entre los 5 y los 10 años.

- *Anomalías de Jordan*: se caracteriza por grandes vacuolas de lípidos en el citoplasma de los granulocitos y monocitos, y a veces en linfocitos y plasmacitos. No cursa con signos clínicos asociados, pero algunos pacientes presentan distrofia muscular progresiva e ictiosis.
- *Neutrofilia gigante*: se transmite en forma autosómica dominante y los neutrófilos miden 17 μ de diámetro. Por lo general, no presenta manifestaciones clínicas.

EOSINÓFILOS

Sus mecanismos de producción, recambio y función están mal estudiados por ser apenas una pequeña proporción de los leucocitos. Se producen solo en la

MO y su vida media es de 7 a 12 horas. Los corticosteroides y la ACTH producen eosinopenia, y la histamina aumenta su producción y liberación.

Función

Toman parte en la respuesta a proteínas extrañas y en problemas alérgicos, y fagocitan complejos antígeno-anticuerpos. La eosinofilia se produce dentro de las 24 horas. Otra función de los eosinófilos es destruir la histamina.

Los gránulos de Charcot-Leyden se observan donde hay muchos eosinófilos.

Anormalidades cuantitativas

Eosinopenia (< 50 eosinófilos/ μ l)

Las causas más comunes son el estrés emocional agudo y crónico, inflamación, anorexia, shock y causas hormonales, entre las que tenemos inyección o liberación de ACTH, hiperplasia adrenocortical, período intermenstrual y acromegalia.

Eosinofilia (> 500 eosinófilos/ μ l)

Debido a la asociación de eosinófilos y respuesta inmune, las causas más comunes son de origen alérgico, tales como asma, fiebre del heno y reacciones a drogas.

Las parasitosis como *Trichinella spiralis*, *Angyostrongylus costarricensis*, *larva migrans* por *Toxocara sp.* y filariasis también presentan eosinofilia, al igual que la dermatitis herpetiforme, la leucemia esinofílica y la enfermedad de Hodgkin (Cuadro N° 4).

Cuadro N° 4. Causas de eosinofilia (> 500 eosinófilos/ μ l)

Parásitos:

- *Infecciones por protozoarios*: *Pneumocistis carinii*, toxoplasmosis, amebiasis, malaria.
- *Infecciones por metazoarios*: *nemátodos*: estrostrongiloidiasis, angiostrongilosis, enterobiasis, ascariasis, toxocariasis (larva migrans visceral), enfermedades por uncinarias, triquinosos, filariasis.
- *Tremátodos*: esquistosomiasis, paragonimiasis, clonorquiasis.
- *Céstodos*: cisticercosis, equinococcosis, taeniasis.
- *Artrópodos*: sarna, niguas.

Desórdenes alérgicos: fiebre del heno, asma, hipersensibilidad, edema angioneurótico, urticaria, enfermedad del suero, vasculitis alérgicas.

Dermatitis: Psoriasis, eczema, dermatitis herpetiforme, prurito, ictiosis.

Cuadro N° 4. Causas de eosinofilia (> 500 eosinófilos/ μ l)
Síndrome hipereosinofílico: leucemia eosinofílica, síndrome de Löffler, poliarteritis nodosa.
Desórdenes gastrointestinales: gastroenteritis eosinofílica, alergia a la leche, colitis ulcerativa.
Desórdenes malignos: micosis fungoide, enfermedad de Hodgkin y leucemia eosinofílica.
Misceláneas: diálisis peritoneal, enfermedad renal crónica, radioterapia.

BASÓFILOS

Función

Los basófilos migran hacia la piel o el peritoneo cuando se inyectan sustancias o proteínas extrañas. Realizan fagocitosis, pero esta no es su principal función. Los basófilos y las células cebadas vierten el contenido de sus gránulos fuera de la célula (exocitosis) después de ser estimulados con irradiación mecánica o en pacientes sensibilizados a antígenos o al frío. Por lo tanto, su principal función parece ser secretora.

Los basófilos contienen una alta concentración de histamina y heparina en sus gránulos. Además de actuar en mecanismos de hipersensibilidad con anti-Ig E, también liberan heparina durante la lipemia post-prandial para favorecer el metabolismo de los triglicéridos.

Anormalidades cuantitativas

Basopenia (< 20 basófilos/ μ l)

Se presenta en reacciones de hipersensibilidad aguda, respuesta hormonal directa a ACTH, tiroxina,

epinefrina, estrógeno y progesterona, y en algunas situaciones por radiación, quimioterapia, infección, ovulación, estado de gravidez y vejez.

Basofilia (> 50 basófilos/ μ l)

Se observa en reacciones de hipersensibilidad producidas por drogas, alimentos, inhalación y eritrodermia, así como en mixedema, colitis ulcerativa, policitemia vera, leucemia granulocítica crónica, leucemia granulocítica basofílica, tuberculosis, diabetes, enfermedad sistémica de células cebadas, postesplenectomía, anemias hemolíticas, influenza, uncinariasis y carcinoma.

SERIE MONOCÍTICA

Los monocitos sanguíneos son el componente circulante del sistema mononuclear fagocítico, que deriva de un precursor común para la serie granulocítica. Solamente el 3% de los monocitos de la MO son promonocitos, los cuales todavía se pueden dividir y presentan citoplasma basófilo. Los monocitos circulantes son células jóvenes que se dirigen hacia los tejidos y ahí se convierten en macrófagos (Figura N° 3).

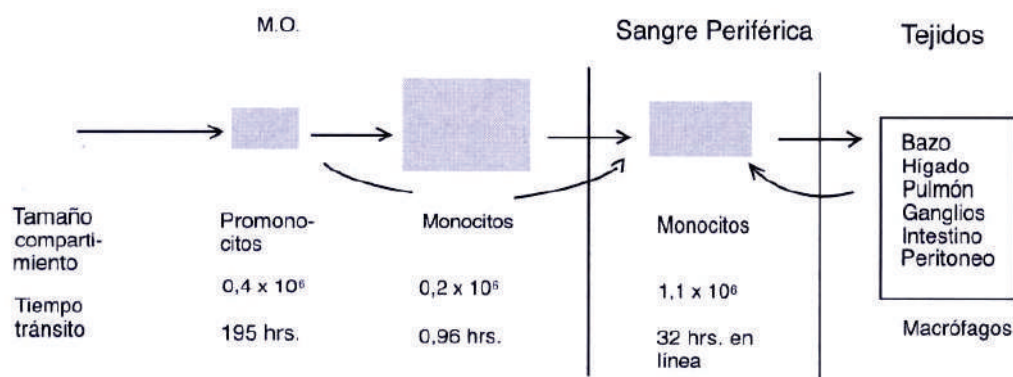


Figura N° 3. Tránsito del monocito desde los tejidos hasta la sangre periférica.

Función

Las áreas de acción del monocito-macrófago son cinco:

1. Defensa contra los microorganismos.
2. Remoción de desechos celulares y materias inorgánicas.
3. Regulación e interacción con la hematopoyesis.
4. Funciones cooperativas y efectoras en la respuesta inmune.
5. Síntesis de componentes biológicamente activos.

Defensa contra los microorganismos

Los monocitos y macrófagos son las principales células contra los parásitos intracelulares y matan o limitan el crecimiento de micobacterias, listeria, toxoplasma, hongos, bacterias y protozoarios. También actúan junto con otras células inmunocomponentes en la

inmunidad contra enfermedades virales y matan directamente virus y células infectadas con virus. Producen interferón y además, aumentan el producido por los linfocitos.

En el 50% de los pacientes con cáncer y en la enfermedad de Chediak-Higashi se ha reportado quimiotaxis anormal de monocitos.

Los monocitos requieren energía para su fagocitosis y aunque no se conocen bien sus mecanismos bactericidas, se piensa que son semejantes al de los neutrófilos: dependientes o no del oxígeno.

Cabe destacar que los pacientes con enfermedad granulomatosa crónica poseen monocitos sin actividad bactericida.

En el Cuadro N° 6 se señalan las entidades que cursan con anormalidad en la fagocitosis de los monocitos.

Cuadro N° 6. Anormalidad en la fagocitosis de los monocitos

Disfunción bactericida:

- Enfermedad granulomatosa crónica.
- Deficiencia de peroxidasa.
- Leucemia mielomonocítica.
- Linfoma.
- Terapia con glucocorticoides.
- *Herpes zoster* y otros virus.

Anormalidades en la quimiotaxis:

- Cáncer (algunos pacientes).

Defectos misceláneos:

- Silicosis.
- Deficiencia genética de C_2 .

Remoción de desechos celulares y de materias orgánicas

Los monocitos-macrófagos recogen restos y remueven células dañadas o moribundas, reconocen eritrocitos viejos o dañados por anticuerpos u otras causas y los remueven de la circulación o de los tejidos. Los macrófagos realizan el catabolismo de la hemoglobina, fagocitan en el bazo restos nucleares y destruyen leucocitos y plaquetas dañadas.

En la enfermedad de Gaucher los macrófagos almacenan mucho cerebrósido, debido a la deficiencia de glucocerebrosidasa, que incapacita el catabolismo de las membranas celulares. En la histiocitosis azul marino, el histiocito presenta deficiencia de esfingomielinasa.

Regulación e interacciones con la hematopoyesis

Las islas eritroblásticas se componen de un macrófago rodeado de normoblastos (eritroblastos), y aunque no se conoce exactamente su función, el hierro del macrófago se transfiere de alguna forma a los normoblastos (proceso llamado rofecitosis).

La actividad estimulante de colonias (AEC) se encuentra tanto en monocitos circulantes como en los macrófagos tisulares.

Funciones cooperativas y efectoras en la respuesta inmune

Los fagocitos juegan un papel crucial, tanto en la inmunidad celular como en la humoral, y operan en el arco

aferente manipulando el antígeno y en el arco eferente actuando como células efectoras. A los monocitos y a los macrófagos se les consideran las principales células del procesamiento de algunos antígenos, debido a que catabolizan y eliminan ciertos minerales potencialmente inmunogénicos y concentran y retienen otras moléculas inmunogénicas. De manera selectiva, los monocitos-macrófagos pueden presentar el antígeno a otras células inmunocompetentes (células dendríticas) y regular así la cantidad de inmunógeno presente. Por supuesto que, en última instancia, los linfocitos son los principales responsables de la especificidad de la respuesta al antígeno.

Los macrófagos también pueden almacenar antígenos por largos períodos, aunque no se sabe cómo los monocitos presentan los antígenos o la información inmune a los linfocitos, a pesar de que el antígeno asociado al RNA ha sido demostrado en ellos, lo que señala un contacto cercano entre linfocitos y monocitos.

Los fagocitos mononucleares (monocitos-macrófagos) son importantes también en la activación del linfocito y en su transformación blástica.

Los macrófagos juegan un papel relevante en la resistencia a la neoplasia y en la destrucción de células tumorales, evitando así las metástasis y el desarrollo de tumores.

Síntesis de compuestos biológicamente activos

Los monocitos elaboran componentes del complemento. En los pacientes con deficiencia del segundo componente del complemento se ha demostrado un defecto biosintético en los monocitos.

Los monocitos también producen factores procoagulantes, pirógenos, el activador del plasminógeno, transferrina, interferón y la actividad estimulante de colonias (AEC).

Anormalidades cuantitativas

Monocitosis (> 1.000 monocitos/ μ l)

Las principales causas de la monocitosis son problemas infecciosos, los cuales se muestran en el Cuadro N° 7.

Cuadro N° 7. Causas de monocitosis
• γ Desórdenes hematológicos: estados preleucémicos, leucemias linfocíticas, granulocíticas y monocíticas, linfomas y enfermedad de Hodgkin, síndromes proliferativos, neutropenia y anemias hemolíticas.
• γ Enfermedades del colágeno: artritis reumatoidea, LED, miositis y poliarteritis nodosa.
• γ Infecciones: tuberculosis, sífilis, brucelosis, salmonelosis, paludismo, kala-azar y rickettsiosis.
• γ Desórdenes gastrointestinales: colitis ulcerativa, sprue y enteritis.
• γ Misceláneas: envenenamiento, síndrome de Hand-Schüller-Christian y posesplenectomía.

SERIE LINFOCÍTICA

Los conceptos acerca del origen y función de los linfocitos han sufrido cambios radicales desde los años sesenta, de modo que las viejas teorías, que consideraban al linfocito como una célula terminal, han sido abandonadas por completo. La idea actual es que la mayor cantidad de los linfocitos está en capacidad de evolucionar.

La serie linfocítica consiste en una sucesión de células que va desde la célula madre comprometida hasta

la producción del linfocito pequeño, en el siguiente orden: linfoblasto - linfocito grande (10-15 μ) - linfocito pequeño (6-9 μ).

El linfocito pequeño se puede transformar debido a mitógenos, como la fitohemaglutinina, o por antígenos, y se convierte en células semejantes a blastos (transformación blástica) o en linfocitos grandes, que posteriormente se convierten en células plasmáticas, pasando por estadios intermedios como las células de Türk o proplasmacitos.

Desde el punto de vista funcional, los linfocitos pueden dividirse en: vírgenes o condicionados, de vida corta o con muchos años de vida, capaces de reconocer antígenos o en células de memoria. Estas funciones no se correlacionan con las características morfológicas.

Origen

Los linfocitos se originan en los órganos linfoides centrales: médula ósea y timo, de donde migran a órganos secundarios: los ganglios linfáticos y el bazo. Después de sufrir activación por reconocimiento antigénico, se devuelven a médula ósea para efectuar funciones inmunológicas.

Migración

A diferencia de los eritrocitos y de las plaquetas, cuya función fisiológica se realiza totalmente en la sangre, y de los granulocitos y monocitos que abandonan la circulación sin volver a ella, los linfocitos entran y salen de la sangre muchas veces durante su vida.

Los linfocitos dejan la circulación predominantemente en los espacios linfoides de los tejidos y se introducen en los conductos linfáticos, para retornar a la circulación por el ducto torácico (recirculación) después de atravesar uno o más nódulos linfáticos. Esta recirculación permite que un gran número de linfocitos T se ponga en contacto con los antígenos. Si no hubiera recirculación, solo algunos pocos linfocitos entrarían en contacto con los antígenos y solo ellos serían capaces de desencadenar la respuesta inmune.

Sobrevida

La supervivencia de los linfocitos es difícil de estimar, debido a la recirculación, a la transformación de los linfocitos en otras células y a que todavía no se conocen todas las causas de muerte y desaparición de estas células. Sin embargo, se asume actualmente que existen dos poblaciones de linfocitos: los que viven de 10 a 20 días y que suman un tercio de los linfocitos circulantes (linfocitos B), y los que pueden vivir desde meses hasta años, los cuales constituyen dos tercios del total y actúan como células de memoria (linfocitos T). En algunos linfocitos humanos se ha documentado un supervivencia de 25 años.

Muerte y desaparición

Algunos linfocitos desaparecen por transformación antigénica. Otros se pierden en el tracto digestivo y en los pulmones. También, un gran número de linfocitos son fagocitados y digeridos por los histiocitos en los nódulos linfáticos, folículos linfoides u otros tejidos.

Esta fagocitosis es extensa en casos de marcada estimulación antigénica.

Tamaño

El tamaño del linfocito, su basofilia o la distribución de su cromatina, no sirve para predecir su edad ni su función. En la actualidad no pueden diferenciarse por morfología los linfocitos vírgenes de los condicionados, ni los de vida corta o larga, ni los B de los T. La diferenciación requiere de condiciones especiales y de estudios de inmunofenotipo (citometría de flujo).

Morfológicamente se pueden diferenciar dos tipos de linfocitos: grandes y pequeños, clasificación arbitraria, ya que también existen formas intermedias. El linfocito grande tiene entre 9 y 15 μ , su núcleo es generalmente central y a veces presenta nucléolo. Puede mostrar granulación azurófila que corresponde a lisosomas. Representan del 5% al 30% de los linfocitos circulantes. El linfocito pequeño mide de 6 a 9 μ , posee densas masas de cromatina, es agranular y el nucléolo se observa solo con tinciones especiales.

Marcadores linfocitarios

Los primeros y más importantes conocimientos acerca de la subdivisión funcional de los linfocitos, se obtuvieron a partir de los experimentos efectuados para estudiar los efectos de la remoción quirúrgica de ciertos órganos linfoides, realizados en los años sesenta. Desde aquel momento nació el concepto de linfocitos B y T.

Linfocitos B

Proviene de la Bursa de Fabricio en las aves y de los análogos de ella en los mamíferos: la MO (el principal órgano), el bazo, los nódulos linfáticos y el tejido linfático asociado al intestino. Por lo tanto, en los mamíferos no hay un órgano único que sirva para la maduración de los linfocitos B. Son los precursores de los plasmacitos que fabrican y secretan los anticuerpos, y su principal función es la participación en la inmunidad humoral.

En la sangre periférica forman del 5% al 15% de los linfocitos circulantes y se definen por la presencia y producción de inmunoglobulinas de superficie.

Cada célula se especializa en la producción de un tipo de inmunoglobulina (M, G, A o E). La mayoría de los linfocitos B son de corta vida, aproximadamente tres días, y pueden actuar también como células ejecutoras (*killer cells*) facilitando la unión entre el antígeno y el anticuerpo.

En resumen, los linfocitos B son los responsables de la inmunidad humoral, se originan en la MO, en los centros germinales y en los folículos centrales de los órganos linfoides, cuentan con poca capacidad de recirculación o de transformación blástica, su supervivencia es corta, no tienen receptores de superficie para los eritrocitos de carnero, son capaces de reconocer antígenos, presentan proliferación clonal, poseen memoria inmunológica y pueden diferenciarse hacia plasmacitos que producen inmunoglobulinas.

Linfocitos T

Se originan de células linfoides pluripotenciales de la MO que migran al timo y que bajo la influencia de la timopoyetina proliferan y maduran. Constituyen del 70% al 80% de los linfocitos de sangre periférica y el 90% de los del conducto torácico.

Están involucrados en la inmunidad celular y tienen un receptor en su superficie para los eritrocitos de carnero.

Tienen una vida media de varios años y gran velocidad para recircular entre la sangre y los tejidos, así como para diferenciarse y transformarse en células blásticas, las cuales muestran una característica morfológica conocida como cuerpo de Gall, que corresponde a la imagen producida por la asociación de lisosomas y gotas de lípidos y que se identifica con microscopía electrónica. Hasta un 20% de los linfocitos CD4 y hasta un 35% de los CD8 muestran cuerpos de Gall.

Bajo estimulación antigénica, previamente procesada por los macrófagos, estos linfocitos almacenan y conservan la memoria inmunológica (células de memoria). Una vez activadas por el antígeno, los linfocitos T se convierten en efectores o ejecutores (*killer cells*) de la inmunidad celular y segregan linfoquinas, sustancias biológicamente activas que sirven de mediadoras en la respuesta inflamatoria. Estas linfoquinas presentan interferón, linfotoxina, factor de transferencia, factor blastogénico y otros.

Algunos linfocitos T (células auxiliares o helper cells) colaboran en la diferenciación que la estimulación antigénica induce en los linfocitos B, convirtiéndolos en plasmacitos, que son los responsables de la

producción de anticuerpos circulantes o inmunidad humoral. Bajo ciertas circunstancias, las células T actúan como moderadores o inhibidores (*Suppressor cells*) de la respuesta al antígeno de los linfocitos B.

En resumen, los linfocitos T son responsables de la inmunidad celular, son de origen tímico, su distribución es perifolicular en los órganos linfoides, cuentan con gran capacidad de recirculación y de transformación blástica, poseen larga vida, presentan receptores de superficie para eritrocitos de carnero, reconocen antígenos, tienen memoria inmunológica, muestran transformación y proliferación clonal, son células ejecutoras de la inmunidad celular y tienen funciones reguladoras de las células B.

Diferenciación entre linfocitos B y T

Los linfocitos B presentan marcadores de membrana que se determinan por inmunofluorescencia y por citometría de flujo. Cada célula posee en su superficie receptores específicos; es decir, cada una transporta multitud de especificidades. Si una célula B encuentra el antígeno complementario, la unión con los receptores iniciará la proliferación clonal de la célula. El clono se diferenciará en plasmacitos que segregarán anticuerpos dirigidos a un mismo antígeno, o en células de memoria de larga vida, las cuales podrán diferenciarse en plasmacitos por reexposición subsecuente a un antígeno igual o similar.

Existen marcadores específicos para las células B y T, que permiten diferenciar el grado de maduración de estas células y que se analizan por medio de citometría de flujo.

Los linfocitos T presentan formación espontánea de rosetas con eritrocitos de carnero y transformación *in vitro* por medio de mitógenos, tales como la fitohemaglutinina.

Función

Las principales funciones del sistema linfático son la producción de anticuerpos circulantes y la expresión de la inmunidad celular, la cual requiere células sensibilizadas en ausencia de anticuerpos, y que incluye la vigilancia inmunológica (Cuadro N° 8).

Cuadro N° 8. Expresiones clínicas de la inmunidad celular	
Anormalidades cuantitativas	
Linfocitopenia (< 1.000/ μ l)	
Principales causas	
a)	Desórdenes de las inmunoglobulinas: 1) Síndrome de Wiskott-Aldrich. 2) Ataxia telangiectasia. 3) Síndromes asociados con timoma. 4) Síndrome de DiGeorge. 5) Agammaglobulinemia tipo suizo.
b)	Destrucción de linfocitos: 1) Irradiación. 2) Quimioterapia por agentes alquilantes. 3) Administración de globulinas antilinfocítica. 4) Aumento de corticosteroides plasmáticos.
c)	Pérdidas de linfocitos por vía intestinal: 1) Drenaje del ducto torácico. 2) Linfagiectasia intestinal.
d)	Desórdenes misceláneos: 1) Enfermedad de Hodgkin.

Linfocitosis (> 4.600/ μ l)

En los niños se encuentra un predominio normal de linfocitos a partir del cuarto mes y hasta el quinto año. La linfocitosis puede producirse por infecciones como tosferina, mononucleosis infecciosa, paperas, rubéola, varicela, sarampión, brucelosis, tifoidea y citomegalovirus. También puede presentarse en la leucemia linfocítica crónica.

Anormalidades funcionales

Existe solo un tipo de granulocitos y de monocitos, pero hay dos tipos de linfocitos: los B que elaboran las inmunoglobulinas y los T que son importantes en la inmunidad celular.

Si la función de los linfocitos B o T se altera, el resultado es un defecto que se manifiesta clínicamente con infecciones recurrentes o con mayor susceptibilidad a enfermedades malignas, a alergia y a enfermedades autoinmunes. La gravedad del cuadro clínico dependerá de la etapa de diferenciación en que se afecte el proceso de las células del sistema inmune.

Se han encontrado defectos en los linfocitos B, en los T y en ambos en un mismo paciente. Las alteraciones pueden presentarse en forma hereditaria o adquirida.

Enfermedades por deficiencia de los linfocitos B

La enfermedad de Bruton es una agammaglobulinemia hereditaria ligada al sexo, que se presenta desde muy temprano en la vida. Cursa con susceptibilidad a infecciones por neumococo y estafilococo, principalmente con problemas de las vías respiratorias, huesos y articulaciones. Se acompaña de invasión pulmonar por *Haemophilus influenzae*, meningococo y, en raras ocasiones, por *Pneumocystis carinii*. Para disminuir la susceptibilidad a los patógenos bacterianos se utiliza la gammaglobulina intravenosa de forma mensual.

Por otra parte, se encuentra la ataxia telangiectasia, que es una enfermedad que presenta deficiencia aislada de inmunoglobulina A, que significa deficiencia parcial de la célula B. Estos pacientes padecen infecciones pulmonares repetidas, especialmente por *Diplococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Haemophilus influenzae*.

Aunque ha podido demostrarse ligera deficiencia de la célula T, por reacción cutánea y por rechazo inadecuado de injertos de piel, no existe en estos pacientes una predisposición relacionada con anomalías de la célula T. Algunos defectos neurológicos progresivos suelen causar la muerte entre los cuatro y doce años de edad.

Enfermedad por deficiencia heredada de los linfocitos B y T

La hipogammaglobulinemia tipo suizo es un padecimiento en el que pueden coexistir diversas infecciones, incluyendo las causadas por patógenos bacterianos, por *Pneumocystis carinii* y por gran número de agentes virales. En estos casos existe un factor genético que inhibe las células madres para que no se transformen en células linfoides, lo que da origen a la ausencia de producción de inmunoglobulinas y de inmunidad celular.

La enfermedad puede identificarse en lactantes por la deficiencia de linfocitos circulantes con la aparición de infecciones recurrentes, sobre todo muguete grave y prolongado. La transmisión se hace en forma recesiva autosómica simple.

A pesar de la administración de anfotericina B contra las monilias y de pentamidina para la infección por *Pneumocystis carinii*, el pronóstico es sombrío y la muerte sobreviene durante los primeros ocho días de vida.

Enfermedades por deficiencia heredada del linfocito T

Existen dos padecimientos conocidos de deficiencia congénita de la célula T: el síndrome de DiGeorge y la enfermedad de Nezelof. Los niños que las padecen mueren durante los primeros años de vida por infecciones virales o por *Candida*. El sistema de los linfocitos B se conserva intacto y las bacterias piógenas no crean dificultad.

Enfermedad por deficiencia adquirida del linfocito B

La deficiencia adquirida de las inmunoglobulinas se observa a menudo asociada a mieloma múltiple, enfermedad de cadena pesada, macroglobulinemia y leucemia linfocítica crónica. La susceptibilidad a las infecciones bacterianas, particularmente la neumonía neumocócica, puede preceder a las otras manifestaciones clínicas del mieloma. El defecto parece

ser un problema de síntesis de inmunoglobulinas y no por un aumento de su catabolismo.

Es muy probable que la susceptibilidad a la infección neumocócica dependa de la formación deficiente de anticuerpos opsonizantes. Los enfermos con mieloma no son susceptibles a las infecciones virales, pero adquieren con frecuencia *Herpes zoster*. Esto sugiere que algunos pacientes también padecen deficiencia de la célula T. La neumonía es la manifestación primaria, la meningitis es rara y el *Staphylococcus aureus* y la *Escherichia coli* son poco frecuentes.

Quienes padecen la enfermedad de cadena pesada mueren por gérmenes patógenos asociados a la deficiencia de la célula B, y los de leucemia linfocítica crónica presentan hipogammaglobulinemia en el 50% de los casos. En ellos se han reportado casos con deficiencia de linfocitos T y de ambas.

Enfermedad por deficiencia adquirida del linfocito T

La deficiencia aislada de la célula T se observa en la enfermedad de Hodgkin, en linfomas, en leucemia linfocítica crónica y en sarcoidosis. En estos pacientes existe anergia cutánea, mientras que el sistema humoral (inmunoglobulinas) es normal. Los microorganismos invasores más frecuentes en estos casos son *Cryptococcus neoformans*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Listeria monocytogenes* y *Nocardia asteroides*.

En el 5% de las personas con enfermedad de Hodgkin y en algunas con leucemia linfocítica crónica o con otras deficiencias adquiridas de la célula T, se presenta tuberculosis pulmonar o extrapulmonar. Por lo tanto, siempre que se observe un infiltrado pulmonar inexplicable, una meningitis con predominio linfocítico o una fiebre de origen oscuro, deberá sospecharse tuberculosis. Como la PPD (derivado proteico purificado) carece de valor en pacientes con deficiencia de la célula T, el diagnóstico debe hacerse por frotis de esputo, por cultivos o por biopsia de un ganglio linfático o del hígado (Cuadro N° 9).

Cuadro N° 9. Relación entre enfermedades con deficiencia de linfocitos y los organismos superinfectantes	
Enfermedad con deficiencia de linfocitos	Gérmenes patógenos
Congénitas	
<i>Deficiencia de célula B:</i> Hipogammaglobulinemia tipo Bruton.	Diplococo, meningococo, <i>Pseudomonas</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Peumocystis carinii</i> .
<i>Deficiencia combinada de células B y T:</i> Agammaglobulinemia tipo suizo.	Diversas bacterias y virus, <i>Candida</i> y <i>P. Carinii</i> .
<i>Deficiencia de célula T:</i> Síndrome de DiGeorge. Enfermedad de Nezelof.	<i>Candida</i> y virus. Virus.
Adquiridas	
<i>Deficiencia de célula B:</i> Mieloma, enfermedad de cadena pesada. Macroglobulinemia, linfoma folicular.	Diplococo, <i>S. aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Herpes zoster</i> .
<i>Deficiencia de células B, T o ambas:</i> Leucemia linfocítica crónica, linfomas, enfermedad de Hodgkin.	<i>Criptococcus</i> , <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Listeria</i> , <i>Nocardia</i> , <i>citomegalovirus</i> .

Anormalidades morfológicas

Síndrome de Sézary

Se presenta como una eritrodermia generalizada con prurito, linfocitos atípicos, infiltración cutánea con linfocitos e histiocitos, linfadenopatía y hepatoesplenomegalia. Es un tipo de linfoma no Hodgkin, de linfocito T, agresivo. Se piensa que este síndrome puede ser la fase leucémica de una micosis fungoide.

Por lo general, las células de Sézary son grandes (15-24 μ), con bordes citoplasmáticos irregulares y citoplasma basófilo muy abundante. Son linfocitos T, contrario a la mayoría de las células en LLC y linfoma no Hodgkin, que son B. La tinción de PAS de estas células es positiva, y morfológicamente pueden confundirse con los linfocitos atípicos que se observan en los problemas virales, aunque se presentan sobre todo con núcleos cerebriformes.

Linfocitos estimulados

En ocasiones, se puede encontrar un pequeño porcentaje de linfocitos estimulados en frotis normales.

Son más grandes que el linfocito normal y presentan núcleo irregular y redondo, con basofilia citoplasmática intensa. Pueden verse en mononucleosis infecciosa, rubeola, toxoplasmosis, hepatitis viral y en algunas reacciones agudas de hipersensibilidad. Representan células con síntesis activa de anticuerpos.

Las características de los linfocitos atípicos son: halo perinuclear, citoplasma muy basófilo y microvacuolización citoplasmática.

Aunque actualmente se usa poco, la clasificación de Downey los divide en tres tipos:

- *Tipo I*: célula madura, pequeña, con citoplasma muy basófilo que recuerda a un linfocito.
- *Tipo II*: más grande, con núcleo irregular que puede ser redondo. El citoplasma es menos basófilo que el tipo I y recuerda a un monocito.
- *Tipo III*: mucho más inmaduro, con núcleo grande con cromatina fina y a veces hasta nucléolos. El citoplasma es basófilo y semeja un blasto.

Algunos linfocitos *plasmacitoides*, con núcleo excéntrico y notable basofilia citoplasmática, se denominan células de Türk y corresponden a proplasmacitos.

SERIE PLASMACÍTICA

Los plasmacitos son la progenie de los linfocitos, pero tienen características morfológicas propias. Miden de 5 a 30 μ , tienen abundante citoplasma basófilo intenso, el núcleo es excéntrico y pequeño y en el citoplasma se observa una zona clara llamada arcoplasma.

Los proplasmacitos son comunes en las discrasias plasmacíticas, en enfermedades inmunológicas caracterizadas por hipergammaglobulinemias, en enfermedades virales e incluso, pueden verse en sujetos normales (células de Türk).

REACCIONES LEUCEMOIDES

Las reacciones leucemoides son una serie de cuadros clínicos con hallazgos de laboratorio semejantes a los procesos leucémicos, los cuales pueden presentarse en infecciones, intoxicaciones, anemias, otras neoplasias o en osteomielopatías. Por lo general, estas reacciones cursan con leucocitosis importantes, pero también pueden semejar leucemia si mostraran pancitopenia.

Procesos infecciosos

Las reacciones causadas por agentes infecciosos pueden parecer leucemias mieloides, linfoides o monocíticas. Las semejantes a leucemia mieloide crónica se pueden ver en peritonitis, septicemia, tuberculosis (TB), difteria, meningitis meningocócica y neumonía. En estos casos puede haber leucocitosis de 20.000 a 100.000/ μ l, con desviación a la izquierda, incluso con unos pocos blastos.

Las reacciones semejantes a leucemia linfocítica aguda se observan en tosferina, varicela, mononucleosis infecciosa y linfocitosis infecciosa.

La TB es la única entidad que puede parecerse a una leucemia monocítica.

Intoxicaciones

En estos casos puede haber leucocitosis hasta de 100.000/ μ l y se presentan en eclampsia, quemaduras graves, intoxicaciones por mercuriales y mordeduras de serpientes.

Anemias

Las anemias que pueden confundirse con procesos leucémicos son las que cursan con reacción leucoeritroblástica, básicamente las que presentan pérdida aguda de sangre, las hemolíticas por sensibilización Rh-Hr y las postrasfusionales.

Neoplasias

Las neoplasias que pueden confundirse con leucemias son aquellas que presentan metástasis a MO, tales como neuroblastoma o algunos carcinomas.

Osteomielopatías

Aquí se incluye la anemia aplásica, los procesos osteocondensantes fibrosos y algunas neoplasias en las que aparecen células jóvenes sin que haya leucocitosis.

INTERPRETACIÓN DEL LEUCOGRAMA

El leucograma es uno de los estudios de más amplia difusión y que brinda gran ayuda. Consta de dos partes: el cómputo de los leucocitos y su análisis diferencial.

Antes de discutir su utilidad, se debe tener presente que para poder interpretar este análisis, es necesario conocer la edad, el sexo y otros antecedentes del paciente. Esto es importante porque los niños pequeños presentan leucocitosis de hasta 15.000/ μ l con marcada linfocitosis, lo que sería anormal en un adulto.

Por otra parte, se debe conocer si el paciente está recibiendo algún tipo de medicación, si está recuperándose de un proceso determinado o si se encuentra en la fase aguda de un cuadro específico. La interpretación del leucograma no puede realizarse como dato aislado de laboratorio, sino como un estudio para obtener un resultado concreto.

El cómputo leucocitario dirá si el paciente está dentro de los límites normales. Si el cómputo es anormal podría ser por leucopenia o por leucocitosis. En cualquiera de los casos, el médico tendrá que analizar si las alteraciones se explican por defectos medulares propios o si forman parte del cuadro global del paciente.

Otro aspecto que brinda el leucograma es el cómputo diferencial. Este siempre debe verse con relación al cómputo total y nunca en forma aislada. El diferencial suministra gran información al clínico, recordando que la correcta interpretación de un diferencial es sobre los valores absolutos de cada tipo de leucocitos. Una eosinofilia marcada podría deberse a problemas parasitarios severos. Si hubiera desviación a la izquierda con cuerpos de Döhle, granulación tóxica y neutrofilia marcada, esto señalaría un proceso infeccioso severo. Si se encontrara linfocitosis, deberá analizarse la morfología de estas células para ver si se observa más del 20% de linfocitos estimulados, lo

que correspondería a una mononucleosis infecciosa. Si se encontrara monocitosis marcada podría tratarse de una TB.

Como se dijo anteriormente, siempre deberá analizarse en conjunto el cómputo y el diferencial, ya que una desviación a la izquierda severa con leucopenia marcada, es un cuadro más severo que uno con leucocitosis. Lo mismo aplica a la serie linfocítica.

El cómputo y el diferencial deben interpretarse junto con la cifra de hemoglobina y los hallazgos clínicos, sin olvidar en ningún momento las inclusiones dentro de los leucocitos o eritrocitos, que se presentan en múltiples situaciones, incluso en cuadros infecciosos como malaria o erlichiosis. En todos los casos, se debe tener presente que la ayuda del médico es de gran utilidad y que los leucogramas seriados en ocasiones suelen ser la única forma de definir algunos cuadros oscuros.

Hay que recordar que en cada leucograma debe observarse la morfología de los eritrocitos, así como el número y tamaño de las plaquetas, los cuales brindarán información adicional muy valiosa. Todos estos datos se obtienen fácilmente de los hemogramas automatizados, que además brindan una serie de valores y de índices hematimétricos de gran importancia a la hora de interpretar un hemograma.

REACCIONES LEUCOERITROBLÁSTICAS

Este término se emplea para indicar que en la sangre periférica se observan granulocitos inmaduros junto a normoblastos (eritroblastos), a veces con plaquetas gigantes, como en los cuadros de hemólisis severa. Los granulocitos se presentan también en casos cuyas médulas son infiltradas por metástasis, o por parásitos intramedulares. Los padecimientos hematológicos malignos con estas características no se consideran reacciones leucoeritroblásticas, porque la presencia de células inmaduras puede ser parte de la enfermedad de fondo del paciente.

BIBLIOGRAFÍA

Abramson N, Melton B. Leukocytosis: basics of clinical assessment. *Am Fam Physician* 2000; 62(9): 2053-2060.

Beck WS. *Hematology*. 4 ed. Cambridge: The MIT Press; 1985.

Bessis M. *Blood smears reinterpreted*. New York: Springer international; 1977.

Cavaillon JM. The historical milestones in the understanding of leukocyte biology initiated by Elie Metchnikoff. *J Leukoc Biol* 2011; 90(3): 413-424.

wwCline MF, Golde DWI. Granulocytes and monocytes: function and functional disorders. En: Hoffbrand AV, Brain MC, Hirsh J. *Recent advances in haematology*. N-2. Londres: Churchill Livingstone; 1977.

Nathan PG, Oski FA. *Hematology of infancy and childhood*. 2 ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co.; 1981.

Penny R. Variations in white-cell function and count. En: Hardisty RM, Watherall DJ. *Blood and its disorders*. Londres: Blackwell Scientific Publications; 1974.

Pérez JL. *Hematología básica*. 2 ed. Caracas, Venezuela: Editorial Cocala; 1987.

Stock W, Hoffman R. White blood cells 1: non-malignant disorders. *Lancet* 2000; 355(9212): 1351-1357.

Williams W, Beutler E, Kipps TJ, Coller BS Casascelli C. *Williams: hematología*. 6 ed. Reimpresión. Madrid: Marbán Libros S.L.; 2007.

Dra. Berta E. Valverde Rojas

GENERALIDADES

Los linfocitos T, B y las células citotóxicas son elementos inmunológicamente competentes, que colaboran con los fagocitos en la defensa del organismo contra las infecciones y otras invasiones extrañas, adicionando especificidad al ataque. Las células accesorias que están implicadas en la activación de los linfocitos son los macrófagos, las células dendríticas, las células de Langerhans, las células de Kupffer, entre otras; mientras que la base molecular está formada por el sistema de complemento, las inmunoglobulinas y las citoquinas.

La activación de los componentes celulares del sistema inmune se encuentra estrechamente relacionada con un grupo de moléculas expresadas en la membrana citoplasmática de las células nucleadas del organismo, conocidas como complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), que son específicas de cada individuo.

Los linfocitos conforman una población heterogénea de células que difieren en origen, vida media, áreas de asentamiento dentro de los órganos linfoides, estructura y función. Estos poseen la capacidad de generar determinada respuesta inmune específica y de memoria. Aunque morfológicamente pueden ser distinguidos de otros grupos celulares, no pueden ser diferenciados entre sí de su linaje y función. El método más preciso empleado en el laboratorio se basa en la identificación de ciertas glicoproteínas, denominadas marcadores, en la membrana de los linfocitos. Dos grandes descubrimientos han ayudado a la aplicación de estos procedimientos en la rutina médica: el desarrollo de anticuerpos monoclonales y la invención de la citometría de flujo.

LINFOCITOS T

Los linfocitos T reciben esta denominación por su maduración intratímica durante la vida fetal y postnatal precoz. Se considera que durante el desarrollo embrionario los progenitores T se originan en el hígado, pasan a médula ósea y luego al timo. Desde el punto de vista histológico, la unidad funcional del timo es el lobulillo tímico, que está constituido por las

zonas subcapsular, cortical y medular. La maduración de los linfocitos T se produce en el tránsito desde la zona subcapsular hasta la medular. Durante este proceso, los precursores CD4-/CD8- entran a la corteza del timo y el receptor de la célula T (TCR, por su denominación en inglés *T cell receptor*) sufre rearreglo y tanto el CD4 como el CD8 son expresados.

Los timocitos (linfocitos T del timo) son sometidos a selección positiva como resultado de la presentación por parte de las células epiteliales corticales de péptidos derivados de antígenos, que pueden ser endógenos y bajo el contexto del CMH-1 o exógenos y bajo el contexto del CMH-2, y conduciendo a la expresión de CD4 o CD8. Posteriormente, son sometidos a selección negativa con apoptosis de las células autorreactivas. Seguido de la presentación de antígenos por parte de células dendríticas o macrófagos, los timocitos maduran a células T con potencial citotóxico o cooperador. Estos linfocitos salen a sangre periférica y llegan a tejido linfóide, donde células presentadoras de antígenos (macrófagos, células dendríticas o linfocitos B) muestran de nuevo antígenos endógenos y exógenos bajo el contexto del CMH 1 y 2, respectivamente. Los linfocitos T CD8+ frente a antígenos endógenos desarrollan su capacidad citotóxica y migran a otros tejidos linfoides a causar apoptosis de las células infectadas por el antígeno. Los linfocitos T CD4+ precursores (Th0) frente a los antígenos y bajo el contexto del CMH apropiado, desarrollan uno de dos tipos de linfocitos T CD4 cooperadores: el Th1 con capacidad cooperadora citotóxica, que activa células NK y macrófagos y media en la respuesta inflamatoria, o el Th2, que es el linfocito cooperador de los linfocitos B, que promueve la producción de eosinófilos y tiene la capacidad de mediar en alergias. Estos dos tipos de cooperadores pueden secretar citoquinas que pueden actuar retroalimentando la respuesta y aumentando la capacidad cooperadora. Además el INF γ secretado por Th1 suprime las células Th2, mientras que el IL4 secretado por Th2 suprime las células Th1 (Figura N° 1).

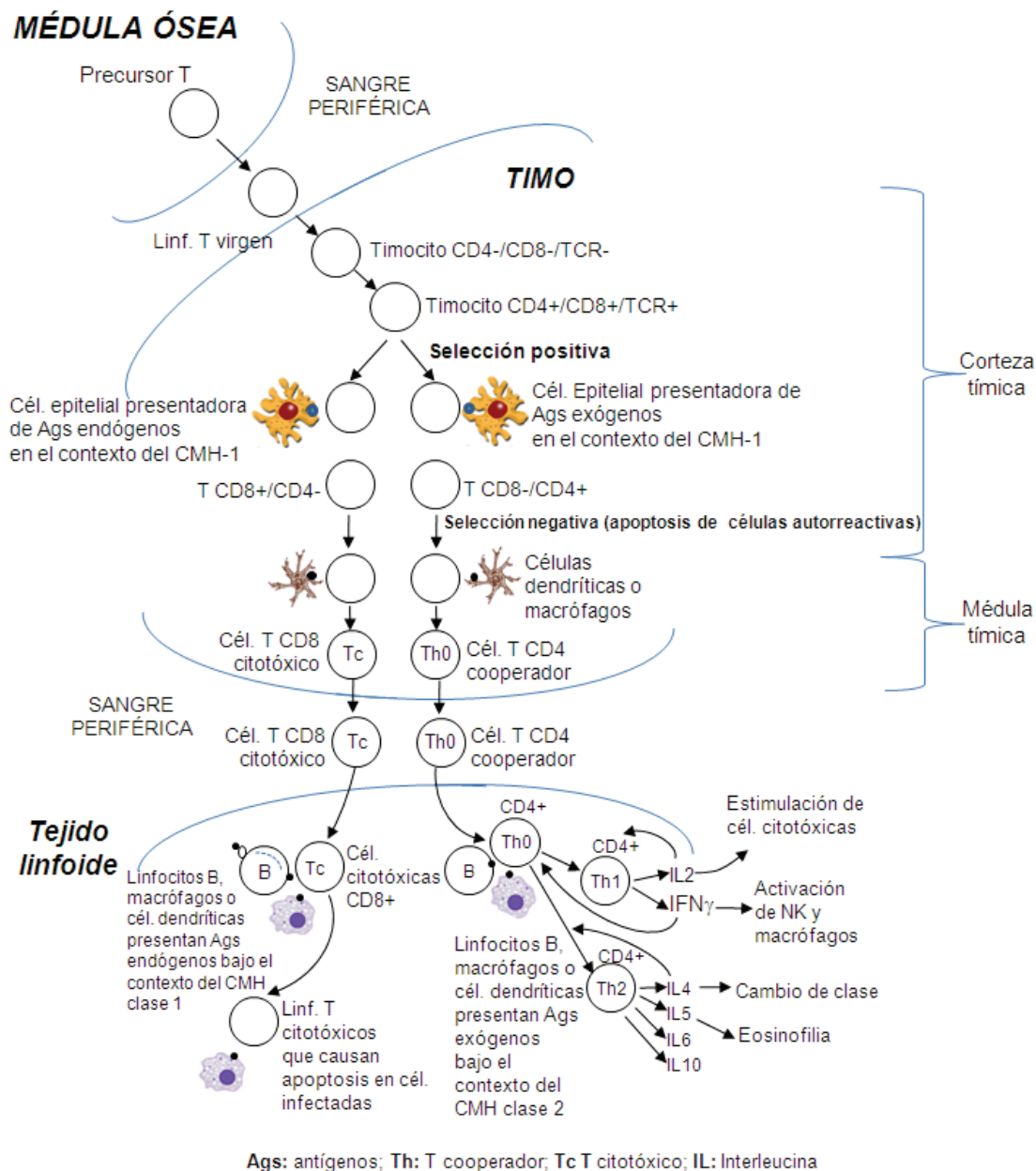


Figura N° 1. Desarrollo del linfocito T.

LINFOCITOS B

Es la única célula capaz de sintetizar inmunoglobulinas en los estadios de célula plasmática y linfocitos B maduro. Las células B se originan de las células precursoras de la médula ósea y llevan a cabo su diferenciación en ella. En las aves este proceso se realiza en la Bursa de Fabricio, que es un órgano equivalente a la médula, y de ahí se deriva nombre. La diferenciación de las células B se acompaña de una serie de cambios en el genotipo (reordenamiento de

los genes de las inmunoglobulinas) y de la adquisición y pérdida de una serie de antígenos en la membrana.

El CD19 constituye un excelente marcador de células B, ya que se detecta incluso antes de que se observen reordenamientos para la cadena pesada de la IgM (Figura N° 2).

El cuadro N° 1 muestra un resumen con los principales aspectos funcionales de las células T y B.

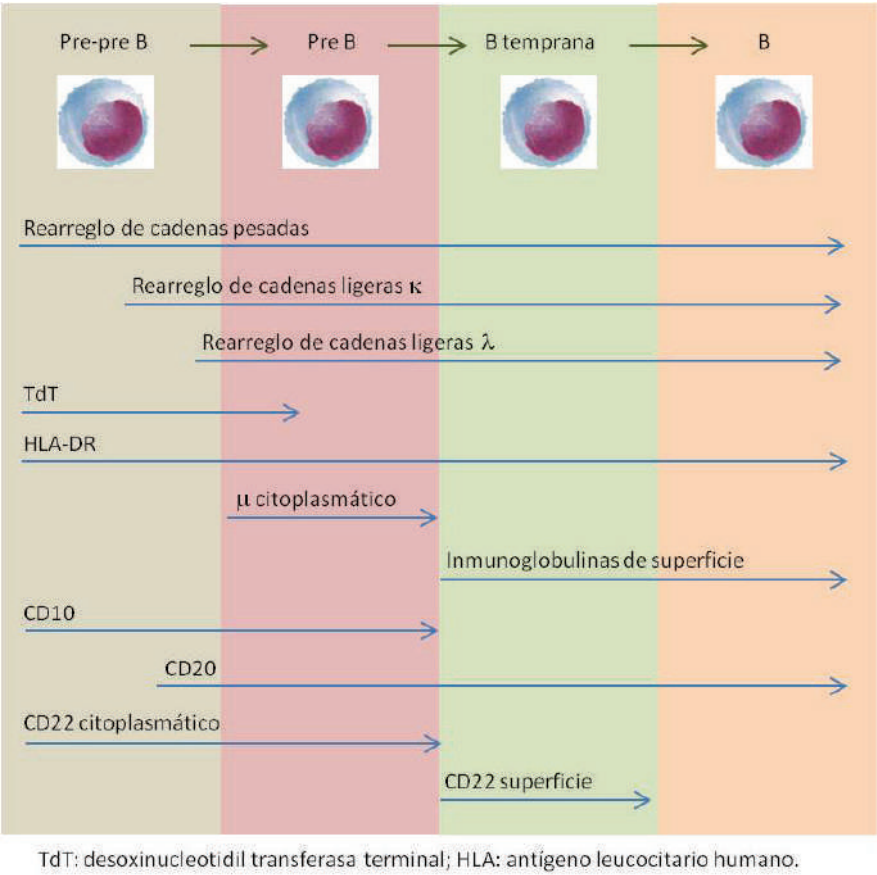


Figura N° 2. Desarrollo del linfocito B.

Cuadro N° 1. Aspectos funcionales de las células T y B		
	Células T	Células B
Origen	Timo.	Médula ósea.
Distribución	Área parafolicular de los ganglios y periarteriolar del bazo.	Centros germinales de ganglios, bazo, intestino, tracto respiratorio. También en área subcapsular y medular de los nódulos linfáticos.
Sangre	80% de los linf. (CD4>CD8).	20% de los linfocitos.
Receptores de membrana	Receptor célula T (TCR). Factores de crecimiento y antígenos.	Receptor para Igs. Complejos inmunes y C3. Factores de crecimiento y Ags.
Marcadores de superficie	CD7 CD2 CD5 CD3 CD4 CD8 CD1.	CD19 CD10 CD20 CD22 CD79.
Función	Inmunidad celular	Inmunidad humoral.
Rearreglos genéticos	TCR α , β , γ , δ	IgH, Igk, Ig λ
Factores de crecimiento y diferenciación	IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-7, IL-9.	TNF, IL-1, IL-4, IL-6, IL7, IL-10, IL-2, IFN γ .

TNF: factor de necrosis tumoral; IFN: interferón; Ags: antígenos; C: complemento; IgH: cadenas pesadas de las inmunoglobulinas; Igk: cadena ligera kappa; Ig λ : cadena ligera lambda; IL: interleuquina.

Células NK

Las células NK (*natural killer*) conforman una población heterogénea con respecto a su fenotipo y a su acción sobre células específicas. Se han encontrado progenitores de las células NK tanto en médula ósea como en timo. Con la expresión de antígenos de linfocito T en su membrana (CD7, CD2) se ha especulado sobre un origen común, pero ante una interferencia con el desarrollo de las células T no se ha documentado ningún impacto sobre las células NK, por lo que se considera que ambos grupos celulares comparten un progenitor común, pero con vías de diferenciación separadas.

Las células NK son consideradas el principal mecanismo de defensa de la inmunidad innata; su función se centra en la acción citotóxica sobre células tumorales y células infectadas por virus. Evidencia reciente relaciona la regulación de la función de las células NK con las moléculas del HLA clase I, por lo que reconocen la identidad biológica de las células propias. Además, tienen capacidad citotóxica mediada por anticuerpos, gracias a la existencia de receptores de baja afinidad a la fracción Fc de la IgG. El estímulo inducido a través de estos receptores provoca la activación de las NK y conduce a la secreción de citoquinas y a la expresión de antígenos de activación.

La mayoría de las NK son CD56, CD57 y CD16, y no expresan el CD3 (TCR). Estas se encuentran en sangre, bazo, médula ósea y en baja proporción en ganglios linfáticos. Después de su activación muestran gránulos prominentes que contienen: perforinas, granzimas, factor de necrosis tumoral tipo b (TNF- β) y proteoglicanos (condroitín sulfato A).

Evaluación de la función de los linfocitos

Técnicas como ELISA, inmunodifusión, electroforesis de proteínas, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real y citometría de flujo son técnicas de laboratorio empleadas para valorar y cuantificar la función linfocitaria.

Inmunoglobulinas

Este es un grupo de proteínas producidas por células plasmáticas y linfocitos B, con capacidad para unirse a los antígenos. Se dividen en cinco subclases o isotipos: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE. La IgG es la más común y contribuye aproximadamente al 80% de las inmunoglobulinas en el suero normal. La IgM suele producirse primero en la respuesta al antígeno, mientras que la IgG se produce posteriormente y por tiempo prolongado. La principal función de las

inmunoglobulinas es la defensa del cuerpo contra organismos externos. Sin embargo, ellas juegan un papel muy importante en la patogénesis de un gran número de desórdenes hematológicos. La secreción de inmunoglobulinas específicas de una población monoclonal de linfocitos o de células plasmáticas se denomina paraproteinemia.

Interleuquinas

Las células T son incapaces de unir antígenos libres en solución, por lo que estos deben ser expresados sobre las células presentadoras del antígeno, bajo el contexto del CMH en forma de péptidos; de esta manera el linfocito T no solo reconoce su propio HLA sino también el antígeno. Durante esas interacciones estructurales de células, se liberan citoquinas tales como IL-1, -2, -4 y -10, denominadas interleuquinas, las cuales actúan modificando la expansión de las células activadas. Estas citoquinas son determinadas en el citoplasma de los linfocitos, mediante técnicas de permeabilización y marcaje con anticuerpos monoclonales dirigidos a la identificación de las proteínas.

Estimulación blástica

Bajo condiciones fisiológicas, la activación del linfocito T es iniciada cuando el receptor de la célula T (TCR) se une al determinante antigénico presentado bajo el contexto del CMH clase I o II. Para que se genere una respuesta, se requiere de al menos tres señales: a) el TCR debe reconocer el CMH como propio, b) la IL-1 producida por la célula presentadora del antígeno se debe unir al receptor correspondiente en el linfocito T, y c) debe haber reconocimiento entre moléculas accesorias de ambas células. La integración de estas señales induce una serie de eventos moleculares y bioquímicos que permiten la activación del ciclo celular y, por consiguiente, la proliferación del linfocito T.

Expresión de antígenos funcionales y receptores

La disposición de los receptores de membrana es un proceso dinámico y muchos de ellos pueden cambiar la expresión y el número de los antígenos de superficie después de la estimulación celular. La expresión basal y las modificaciones que sufren regulan las interacciones célula-célula, poblando los sitios de inflamación, quimiotaxis, reactividad contra agonistas y degranulación.

BIBLIOGRAFÍA

Bain BJ. A-Z of hematology. Oxford: Blackwell Publishing Ltd; 2003.

Hoffbrand AV, Moss PA, Pettit JE. Essential haematology. 5 ed. Malden, Mass.: Blackwell Publishing Ltd; 2006.

Hsu KC, Dupont B. Natural killer cell receptors: regulating innate immune responses to hematologic malignancy. *Semin Hematol* 2005; 42(2): 91-103.

Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ (editores). Immunobiology. 6 ed. New York: Garland Science; 2004.

Macey M. Flow cytometry. Principles and applications. Totowa: Human Press Inc., 2007.

HALLAZGOS HEMATOLÓGICOS EN PROCESOS INFECCIOSOS

*Dr. Rolando Ulloa Gutiérrez
Dr. Jorge Elizondo Almeida
Dr. German F. Sáenz Renauld*

GENERALIDADES

Los procesos infecciosos pueden ser de origen bacteriano, viral, parasitario o micótico. Desde el punto de vista de diagnóstico, el aislamiento del agente causal específico, las manifestaciones clínicas y los hallazgos en las pruebas de laboratorio son claves para definir las estrategias diagnósticas y terapéuticas subsecuentes.

Por lo general, todo proceso infeccioso genera una respuesta inflamatoria que inicialmente libera citoquinas inflamatorias, debido al estímulo sobre el sistema retículo endotelial, y produce además alteraciones en los hallazgos hematológicos, como en el hemograma, (anemia, neutrofilia, leucopenia, trombocitopenia), en el fibrinógeno, en la velocidad de sedimentación globular, en la proteína C reactiva, en la procalcitonina y en algunos otros reactantes de fase aguda, como las interleucinas 1, 6, 8, el factor de necrosis tumoral α y la neopterina (liberada por el macrófago con la activación de la inmunidad celular). También se producirán alteraciones en las pruebas de funcionamiento de los diversos órganos afectados y en los exámenes analíticos específicos para la entidad causal que se sospeche.

Es importante tener presente que el análisis cuidadoso del tipo de célula hematológica alterada, muchas veces puede dar claridad sobre la etiología del proceso infeccioso. Por ejemplo, diversas enfermedades bacterianas, micóticas, espiroquetales, virales y parasitarias pueden ocasionar neutrofilia.

La neutropenia, por otro lado, se manifiesta frecuentemente en problemas infecciosos, entre los que predomina la fiebre tifoidea, la brucelosis, las infecciones virales (rubéola, sarampión, hepatitis, mononucleosis infecciosa), el tifo, la malaria, el kala-azar y la toxoplasmosis.

En el caso de la monocitosis, esta se puede observar en tuberculosis y en enfermedades como sífilis, brucelosis, salmonelosis, paludismo, kala-azar y rickettsiosis.

La eosinofilia, como manifestación de respuesta a proteínas extrañas, problemas alérgicos y fagocitosis de complejos antígeno-anticuerpo, es típica de la infección parasitaria.

Debido a que el basófilo ejerce cierta acción fagocítica, podría expresarse como basofilia en enfermedades como tuberculosis.

Cuando se presenta una linfocitosis a partir de linfocitos normales inactivados se puede pensar en linfocitosis infecciosa, varicela, rubeola, herpes simple, tuberculosis o influenza. Mientras que si la linfocitosis es a partir de linfocitos atípicos o activados se debe pensar en mononucleosis infecciosa, toxoplasmosis, hepatitis infecciosa o infección por citomegalovirus.

Otras manifestaciones como anemia asociada a enfermedad crónica (concentración baja de hierro sérico y normales o altas de ferritina en suero) podrían implicar un proceso infeccioso crónico de fondo. Anemia asociada a hemólisis (anemia y reticulocitosis en ausencia de sangrado) es indicativa de procesos infecciosos severos como septicemia o exotoxemia por clostridios.

A continuación se muestra un resumen con las principales alteraciones del hemograma en procesos infecciosos (Cuadro N° 1).

Cuadro N° 1. Hemograma en procesos infecciosos		
Proceso	Agente infeccioso	Leucocitos
Eosinofilia		> de 500 eosinófilos/ μ l
Infección por protozoarios	<i>Pneumocystis jirovecii</i> (antes llamado <i>Pneumocystis carinii</i>), amebiasis, malaria, toxoplasmosis.	
Infección por metazoarios	Nemátodos: estrongiloidiasis, ascaris, angiostrongilosis, enterobiasis, filariasis, toxocariasis, uncinariasis, triquinosis.	
	Tremátodos: esquistosomiasis, paragonimiasis, clonorquiasis.	
	Céstodos: cisticercosis, equinococosis, taeniasis.	
	Artrópodos: escabiosis, tunga o nigua.	
Neutrofilia	Enfermedades micóticas, espiroquetales, virales y parasitarias.	> de 7.000 neutrófilos/ μ l
Neutropenia	Fiebre tifoidea, brucelosis, infecciones virales (rubéola, hepatitis, sarampión, mononucleosis infecciosa), tifo, malaria, kala-azar y toxoplasmosis	< de 1.200 neutrófilos/ μ l
Basofilia	Tuberculosis	> de 50 basófilos/ μ l
Linfocitosis		< de 4.600 linfocitos/ μ l
- Linfocitos normales inactivados	Linfocitosis infecciosa, varicela, rubeola, herpes simple tuberculosis o influenza	
- Linfocitos atípicos o activados	Mononucleosis infecciosa, toxoplasmosis, hepatitis infecciosa o infección por citomegalovirus	
Monocitosis	Tuberculosis, sífilis, tifoidea, brucelosis, salmonelosis, paludismo, kala-azar y rickettsiosis	

INFECCIONES PARASITARIAS

Las infecciones parasitarias son frecuentes en todo el mundo, aunque algunas predominan en zonas tropicales y semitropicales, al menos las altamente prevalentes, como la malaria, las nematodosis intestinales, la leishmaniasis, entre otras. Las parasitosis constituyen una causa importante de eosinofilia. Ejemplos clásicos son las infestaciones intestinales por nemátodos y céstodos, la toxocariasis, la filariasis y otros gusanos o larvas migratorias. Es menos intensa la eosinofilia en la infección por protozoarios, como en el caso de la giardiasis y la amebiasis.

En algunos padecimientos provocados por parásitos, también se trastorna significativamente la velocidad

de eritrosedimentación (VES) y hay alteraciones de las globulinas séricas, con aumento de las gammaglobulinas. En ciertos parásitos intestinales, la concomitancia de una disgammaglobulinemia con disminución de la IgA incrementa la incidencia de las parasitosis. En asociación con anemia, en algunas parasitosis deletéreas (esquistosomiasis intestinal, estrongiloidiasis severa) se halla con frecuencia leucocitosis, hipergammaglobulinemia, hipoalbuminemia y eosinofilia.

En el campo de la microbiología bacteriana micótica y viral, es posible generalizar y decir que cualquier microorganismo patógeno que persista más de dos a tres semanas en los tejidos humanos es capaz de originar anemia. Si se toma en cuenta el gran número de padecimientos infecciosos y los diversos mecanismos

que pueden originar anemia, su estudio y clasificación resultan complicados. Existen, sin embargo, grupos que comparten características comunes:

1. Anemias secundarias a infecciones crónicas.
2. Anemias secundarias a padecimientos infecciosos en las que la hemólisis es su mecanismo principal de producción.
3. Anemia asociada al síndrome de inmunodeficiencia adquirida (Sida).

Las anemias secundarias a infecciones crónicas se desarrollan de modo gradual y con frecuencia los niveles de hemoglobina varían entre 9 y 12 g/dl. Este tipo de infecciones ocasionan manifestaciones generalizadas como fiebre y pérdida de peso. La

gravedad de la anemia tiene cierta correlación con la intensidad de estos síntomas y con los signos de inflamación y supuración.

Los mecanismos inductores de estas formas de anemia corresponden a la llamada “anemia de la enfermedad crónica”, que se correlaciona con el metabolismo del hierro, específicamente, con la disminución en la disponibilidad del hierro circulante.

Los ejemplos de entidades crónicas, tanto bacterianas como micóticas, capaces de producir esta forma de anemia son muy numerosos. En el Cuadro N° 2 se anotan los principales padecimientos y sus agentes etiológicos más comunes.

Cuadro N° 2. Padecimientos y agentes etiológicos que pueden producir anemia de infecciones crónicas	
Padecimiento	Agente etiológico común
Infección pulmonar	<i>M. tuberculosis</i> , <i>Histoplasma capsulatum</i> , bacterias spp.
Empiema	<i>Staphylococcus aureus</i> , bacterias gram negativas.
Meningitis	<i>M. tuberculosis</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> .
Infecciones urinarias	<i>Coccidioides immitis</i> , gérmenes gram negativos.
Endocarditis	<i>Staphylococcus</i> y <i>Streptococcus</i> spp, <i>candida albicans</i> .
Peritonitis	<i>M. tuberculosis</i> .
Abscesos intraabdominales	Bacterias anaeróbicas y bacilos gram negativos.
Osteomielitis	<i>Staphylococcus aureus</i> , bacterias anaeróbicas.

Otra condición la constituyen las anemias hemolíticas secundarias a infecciones parasitarias, que pueden dividirse en dos grupos: las mediadas por anticuerpos (ya analizadas en el Capítulo 10) y las que son producidas por efecto del agente patógeno. En estas últimas no existe clara evidencia de algún defecto

intrínseco en los eritrocitos, ni de la presencia de anticuerpos dirigidos contra estas células. Se trata, pues, de anemias hemolíticas no inmunológicas, que son consecuencia de la acción directa del agente infeccioso en contra del eritrocito o de sus productos (Cuadro N° 3).

Cuadro N° 3. Agentes infecciosos que producen anemia hemolítica no inmunológica	
Protozoarios	Bacterias
<i>Plasmodium</i> <i>Toxoplasma</i> <i>Leishmania</i> <i>Tripanosomas</i> Otros	<i>Bartonella</i> <i>Clostridios</i> <i>Vibrio cholerae</i> <i>M. tuberculosis</i>

Malaria

La malaria (paludismo) es la más importante de las enfermedades causadas por protozoarios. México, Centroamérica y Haití son zonas endémicas de este problema infeccioso. Una manifestación común es la anemia. Su prevalencia y grado dependen del estado nutricional e inmune de los pacientes. Por lo general, la anemia tiende a ser más común y más profunda en razón inversa a la edad. Los factores más importantes en la producción de esta anemia hemolítica son: la digestión de la hemoglobina y la lisis celular originadas por la invasión eritrocítica. De hecho, la mayoría de las manifestaciones hematológicas del paludismo se relacionan con la invasión del eritrocito por el parásito.

De las especies que infectan al ser humano, el *P. vivax* y el *P. ovale* invaden sólo los reticulocitos; el *P. malariae* ataca únicamente células maduras; y el *P. falciparum* infecta eritrocitos en todos los estadios de maduración, lo que explica la intensidad de la infección producida por esta última. Tales patrones de invasión sugieren que los diferentes parásitos plasmodiales utilizan diversos receptores.

Todas estas variedades desarrollan un ciclo evolutivo similar, constituido por una fase asexual que se realiza en el ser humano y que comprende, a su vez, una fase exoeritrocitaria y otra eritrocitaria, así como una fase sexual que se realiza en el mosquito. Al picar, el mosquito introduce en la circulación al parásito en forma de esporozoitos, los cuales emigran al hígado, donde los hepatocitos se dividen en numerosos elementos hijos (fase de esquizogonia exoeritrocitaria). Transcurridos unos días pasan de nuevo a la sangre y penetran en los eritrocitos, donde se transforman en corpúsculos específicos llamados esquizontes, que se dividen luego, dando lugar a un número variable de merozoitos. Posteriormente, los eritrocitos se rompen, liberando miles de merozoitos, que entran de nuevo en la circulación e invaden otros eritrocitos. Los *Plasmodium malariae* y *falciparum* se rompen todos al mismo tiempo, sin persistir en el hígado; en cambio, los *Plasmodium vivax* y *ovale* en ocasiones persisten en el hígado como formas latentes, dando reactivaciones en meses o años.

Solamente los eritrocitos jóvenes son susceptibles al *P. vivax* y *ovale*; sin embargo, el *P. falciparum* ataca todos los eritrocitos, por lo que es más virulento. Los eritrocitos que contienen ciertas hemoglobinas anormales como la S y la C son resistentes al *P. falciparum*, lo mismo que aquellos que son deficientes en la glucosa-6-fosfato-dehidrogenasa; mientras que los glóbulos rojos Duffy negativos son resistentes al *P. vivax*.

El cuadro clínico se inicia con fiebre alta y escalofríos. Hay diaforesis intensa, vómitos y deshidratación. Los cuadros febriles en el caso del *P. vivax* y el *ovale* se producen cada 48 horas; en el *P. malariae* las fiebres terciarias son irregulares y cada 72 horas; y en el *P. falciparum* en ocasiones son continuas. Además de la anemia, pueden observarse neutropenia y trombocitopenia discretas. La destrucción eritrocítica crónica puede producir esplenomegalia, que puede complicar el cuadro al agravar la pancitopenia por hiperesplenismo.

Cuando el ataque es virulento, en especial en los casos del *P. falciparum* con más del 10% de eritrocitos parasitados, se puede producir una hemólisis masiva, predominantemente intravascular, con la presencia de hemoglobinuria con nefritis tubular y coagulación intravascular diseminada, así como también activación de las plaquetas con secuestro esplénico, eritrofagocitosis y cambios diseritropoyéticos con eritropoyesis ineficaz en la médula ósea. Estos casos se conocen como "Fiebre del agua negra" ("*Black water fever*").

La gran invasión parasitaria intraeritrocítica altera la deformabilidad del eritrocito, lo que produce el estancamiento de estos y obstrucción secundaria de los capilares. Esta situación sería la que produce graves alteraciones, como hipoxia con daño hepático, pulmonar y cerebral (malaria cerebral). En ciertos casos de *P. malariae* se han descrito cuadros con la formación de complejos inmunes que atacan a los glomérulos, provocando nefritis, y a la médula ósea, ocasionando aplasia.

En cuanto a las alteraciones de los ganglios linfáticos en la malaria, es infrecuente la presencia de linfadenopatías superficiales; estas se observan ocasionalmente en los niños con infecciones por *Plasmodium falciparum* o en formas crónicas en pacientes caquéticos.

Los ganglios linfáticos muestran un crecimiento de los senos con muchos macrófagos, linfocitos y algunos eritrocitos. Los macrófagos presentan pigmento malarico. Los folículos y centros germinales suelen ser pequeños y, a veces, ausentes. El patrón febril y el leucograma de los primeros días de la infección se asemejan a los observados en las etapas incipientes de otras enfermedades bacterianas, víricas y parasitarias (leucopenia y desviación izquierda). Actualmente, mediante la técnica de reacción de cadena de polimerasa (PCR) se puede demostrar la presencia del parásito en la sangre y detectar Ag circulantes del plasmodio. Los anticuerpos demostrables por IFA pueden aparecer después de la primera semana de infección y persistir

por años, indicando una enfermedad palúdica previa, lo cual no es útil para el diagnóstico presente.

Leishmaniasis

Leishmania spp incluye un grupo de parásitos principalmente intracelulares, que infectan las células del sistema mononuclear fagocítico (SMF). Existen varias especies de *Leishmania* que afectan al ser humano: la *L. donovani*, que causa la leishmaniasis visceral o Kala-azar, distribuida en el viejo mundo; la *L. chagasi*, responsable de la variedad visceral del nuevo mundo; la *L. trópica*, que produce la variedad cutánea del viejo continente; la *L. mexicana* que causa la cutánea del nuevo mundo; y la *L. Brasilensis*, que produce la variedad mucocutánea americana. Todas estas especies son morfológicamente parecidas, pero parecen tener diferencias en cuanto a su estructura antigénica.

La leishmaniasis visceral está distribuida en todo el mundo, excepto en el continente australiano. En África del Norte, la India y China, la llamada Kala-azar es causada por la *L. donovani*; en Europa Mediterránea existe la variedad infantil producida por la *L. infantum*; en América Central y del Sur, en especial en la vertiente atlántica (El Salvador, Guatemala, Venezuela, Brasil, Argentina, Paraguay, Perú, Colombia, Ecuador), es causada por la *L. chagasi* y se le conoce como leishmaniasis visceral del nuevo mundo. En Costa Rica solo se ha encontrado en un niño, en apariencia un caso autóctono. En estos casos la anemia es multifactorial, principalmente hemolítica. Está causada sobre todo por destrucción eritrocítica en el bazo, y puede verse agravada por hemorragias gastrointestinales y compromiso autoinmune. Asimismo, hay invasión parasitaria de los macrófagos de otros tejidos como ganglios linfáticos, células de Kupffer en el hígado y de la mucosa intestinal, donde pueden causar ulceraciones. El hiperesplenismo también puede dar neutropenia y trombocitopenia con síntomas purpúricos.

En general, los síntomas clásicos de la enfermedad son fiebre, debilidad, adelgazamiento, anemia y hepatoesplenomegalias considerables. Además, se detecta una moderada linfadenomegalia.

El diagnóstico se hace demostrando la presencia de leishmanias en cortes histológicos o aspirados de tejidos. En el ganglio linfático también es fundamental el hallazgo del parásito en el citoplasma de los macrófagos. Además, en este tipo de enfermedad hay una marcada proliferación de plasmacitos y sus precursores, por lo que es común encontrar muchos cuerpos de Russell y cristales proteicos eosinofílicos.

Enfermedad de Chagas

La linfadenitis es un síntoma común en las fases iniciales de la enfermedad de Chagas, causada por el *Trypanosoma cruzii*, a través de mosquitos vectores de los géneros *Triatoma* y *Rhodnius*. La penetración del microorganismo se produce por múltiples escoriaciones de las membranas mucosas, especialmente de la conjuntiva, con posterior conjuntivitis y linfadenopatía (signo de Romaña). La progresión de la enfermedad, con afección cardíaca y del tubo gastrointestinal, ha sido una importante causa de muerte en América del Sur. Si bien es cierto en Costa Rica se han documentado casos en niños y adultos, no se conoce con exactitud el impacto médico de esta tripanosomiasis, salvo la cardiopatía que genera.

En la mayoría de los casos, en la fase inicial aparece un aumento de tamaño de los ganglios linfáticos, confinado a los ganglios de drenaje de la puerta de entrada del parásito en el organismo. Posteriormente, puede haber adenopatías generalizadas junto a otras manifestaciones clínicas.

El cuadro histológico muestra una proliferación de macrófagos en el lugar donde se produce la metamorfosis de la variedad de amastigoto. En este punto dicho cuadro es absolutamente igual al de la leishmaniasis (apartado anterior). Las células parasitadas se rompen liberando los parásitos, los cuales invaden otros órganos y tejidos, con secuelas graves, frecuentemente fatales.

El diagnóstico de la enfermedad en la fase aguda se confirma al demostrar el tripanosoma en la sangre (directo, hemoconcentración, cultivo o xenodiagnóstico). Los estudios serológicos son importantes para el diagnóstico individual y también para la detección de casos en grandes grupos. La coinfección con el VIH puede precipitar una forma muy severa de la enfermedad.

Amebiasis

A pesar de que la *Entamoeba histolytica* puede infectar los ganglios linfáticos, este hecho es clínica e histológicamente raro. El cuadro puede simular, en algunos casos, un tumor en la región ileocecal y en el recto, denominado "ameboma". Allí las amebas están confinadas habitualmente en pequeños focos de necrosis, afectando los senos. En personas homosexuales se pueden presentar lesiones en el pene, ano y recto. Las pruebas ELISA ("enzyme-linked immunosorbent assay") son muy útiles en el diagnóstico de enfermedad invasora (hígado, pulmón, etc.).

Por lo general, los ganglios linfáticos presentan alteraciones crónicas no específicas, con leve fibrosis. Puede observarse cierto grado de hiperplasia de los macrófagos de los senos, con ingestión de linfocitos y eritrocitos que deben diferenciarse de los parásitos.

Ascaridiasis

Esta es una helmintiasis muy frecuente en el mundo, sobre todo en los países subdesarrollados. Sin embargo, es raro encontrar las larvas de ese parásito en muestras histológicas. Algunas larvas, en su desarrollo dentro del organismo humano, pueden morir aprisionadas en los ganglios linfáticos y convertirse en el centro de una reacción inflamatoria, compuesta en un inicio por eosinófilos y neutrófilos y, posteriormente, presentar histiocitos en una zona periférica de eosinófilos. Finalmente, se produce una proliferación linfocitaria. Esta fase tiene un aspecto tuberculoide y, algunas veces, presenta formación de células gigantes.

La ascaridiasis junto con la toxocariasis, la estrongiloidosis y la anquilostomiasis, constituyen el aspecto histológico de la "larva migratoria visceral".

Toxocariasis (Síndrome de larva migrans visceral)

La toxocariasis es una infección producida por los parásitos *Toxocara canis* y *Toxocara catti*. Cuando los niños ingieren los huevos de estos gusanos se forman granulomas en los ganglios linfáticos mesentéricos, principalmente después de la muerte de las larvas.

Esta infección tiene un carácter más inflamatorio que la ascaridiasis, e incluso, puede dar lugar a necrosis e infiltración acentuada de neutrófilos y aumento de eosinófilos. En sangre periférica es característica la eosinofilia y el aumento de la VES. Las técnicas ELISA practicadas con antígenos de la fase larvaria tienen una sensibilidad de 75-90% para detectar la larva migrans visceral y en las infecciones oculares que pueden semejar un retinoblastoma.

Estrongiloidosis

Es la infección adquirida por la penetración de la larva filaróide a través de la piel. Los ganglios linfáticos pueden albergar ocasionalmente la larva en su trayecto hacia los pulmones. La diseminación larval se incrementa en pacientes con algún grado de inmunosupresión. La afección ganglionar es semejante a las lesiones descritas en los apartados anteriores. La eosinofilia suele ser moderada (10-25%) en la fase crónica, pero puede ser normal o baja en caso de diseminación, tal y como sucede en el huésped inmunodeficiente.

Anquilostomiasis

Presenta un cuadro de infección semejante al *Strongyloides*, aunque existen datos conflictivos en cuanto al aspecto histológico de los ganglios linfáticos del mesenterio. Se observa, por un lado, una considerable atrofia del tejido linfoide, con eosinófilos dispersos y ausencia de plasmacitos; pero, por otro lado, aparece un cuadro histológico de hiperplasia folicular e infiltración eosinófila focal muy marcada, con numerosos plasmocitos. Contrario de la infestación por *Ancylostoma* y *Necator*, las larvas de *Ancylostoma caninum* mueren dentro de la piel y producen larvas migrans cutánea, con eosinofilia temporal.

Angiostrongiliasis abdominal

La especie *A. costarricensis* se adquiere por ingestión de larvas del tercer estadio, desarrolladas en el huésped intermediario (la babosa). La enfermedad suele cursar con dolor abdominal de predominio en fosa iliaca o cuadrante inferior derechos y fiebre en menor frecuencia. En algunos casos puede confundirse con apendicitis aguda, sobre todo en niños menores de 13 años. Usualmente, la leucocitosis es considerable y la eosinofilia es mayor al 20%. En las biopsias se observan huevos y larvas en los ganglios linfáticos. Además, se detectan vermes adultos en las arterias finas (zona ileocecal). En general, los huevos y larvas degeneran y ocasionan una lesión parenquimatosa.

Enterobiasis

A diferencia de los parásitos hasta ahora mencionados, el *Enterobius vermicularis* no suele penetrar en el organismo del huésped, sino que permanece en el tubo digestivo. Eventualmente, los huevos pueden invadir los tejidos, produciendo un absceso y, tardíamente, un granuloma tuberculoide. Es muy raro el paso del *Enterobius* a los ganglios linfáticos. En los casos en que esto se ha observado, el aspecto histológico es de un absceso o granuloma tuberculoide, siendo muy difícil la confirmación de la presencia del parásito.

Tricuriasis

Trichurus trichura tiene un ciclo semejante al *Enterobius*. Sin embargo, el parásito adulto ataca a las mucosas del ciego y colon ascendente, y cuando hay una proliferación masiva de larvas, estas pueden alcanzar los ganglios linfáticos y causar una intususcepción ileocecal. El cuadro histológico es semejante al de la enterobiasis. En niños con gran número de tricocéfalos puede producirse prolapso rectal, hipoproteínemia, anemia y retardo del crecimiento.

Filariasis

Varios tipos de filarias pueden causar alteraciones en los ganglios linfáticos. Las más comunes son la *Wuchereria bancrofti* y la *Brugia malayi*. La infección por la *W. bancrofti* está muy extendida en las regiones tropicales y subtropicales (como en Limón, Costa Rica), y los síntomas clínicos son mucho menos frecuentes que la infección.

Cuando la infección es causada por los vermes adultos se promueve una linfagitis con obstrucción fibrosa de los vasos linfáticos y linfedema grave (elefantiasis). Las macrofilarias pueden encontrarse en los ganglios linfáticos, los cuales pueden estar muy dilatados, con una hiperplasia folicular y una proliferación acentuada de plasmacitos y eosinófilos. Eventualmente, forman microabscesos o granulomas tuberculoideos. A veces el parásito puede permanecer en el centro germinal, promoviendo una gran eosinofilia y depósito de material, como inmunoglobulinas.

El cuadro clínico es variado, con manifestaciones clínicas que van desde el paciente asintomático, con o sin filaremia, fiebre recurrente aguda por filarias, linfadenitis y linfangitis retrógrada; otros con hidrocele, quiluria y elefantiasis de los miembros, mamas y genitales, sin relación alguna con la tasa de microfilaremia; hasta personas con eosinofilia pulmonar tropical, caracterizada por asma paroxística nocturna, fiebre profunda y eosinofilia.

Cisticercosis

La larva de la *Taenia solium*, parásito del cerdo, puede estar raramente asociada a la invaginación intestinal. En los raros casos con alteración de ganglios linfáticos abdominales en los que hay grave infección parasitaria, el aspecto histológico es inespecífico y semejante al de los metazoos antes descritos. La cisticercosis puede producir enfermedad somática grave, que afecta por lo común al sistema nervioso central (SNC): neurocisticercosis. Los estudios serológicos específicos deben confirmar el diagnóstico clínico. La cisticercosis intracerebral y de otros tejidos puede diagnosticarse por ultrasonido, tomografía axial computarizada, resonancia magnética o por radiografías cuando se calcifican los cisticercos.

De otras infecciones por protozoarios

En la toxoplasmosis, tanto congénita como adquirida, se ha comunicado anemia hemolítica, así como en kala-azar (leishmaniasis visceral). La anemia por "enfermedad del sueño", en África, es un hallazgo muy común. Esta entidad, a menudo fatal, es causada

por *Trypanosoma gambiense* y *T. rhodesiense*; la infección por este último origina un curso más crónico. Estos parásitos son transmitidos al ser humano y a los animales domésticos por la mosca tsetsé.

Algunas infecciones del intestino delgado

•y **Malabsorción intestinal:** la anemia macrocítica o dimórfica por problemas carenciales debido a la deficiencia de hierro, folato y vitamina B₁₂ pueden verse indistintamente en las diferentes patologías que cursan con malabsorción intestinal, como son:

1. Parasitosis intestinal (*Strongyloides stercoralis*, *Giardia lamblia*).
2. Sprue tropical.
3. Enfermedad celíaca.
4. Enfermedad de Whipple.
5. Sobrecrecimiento bacteriano (síndrome del asa ciega).
6. Resección intestinal.
7. Linfoma intestinal.
8. Enfermedad de Crohn.
9. Síndrome de inmunodeficiencia adquirida por infecciones oportunistas del intestino y/o la enteropatía propia del virus de inmunodeficiencia humana.

Los nematodos, representados por el *Ancylostoma duodenale* y el *Necator americanus*, provocan daño a través de su mecanismo de nutrición, por el que son extraídos entre 0,2 y 0,7 ml de sangre al día por cada parásito, y también producen pérdidas crónicas, que originan una anemia ferropénica.

•y **La amebiasis intestinal:** causada por la *Entamoeba histolytica*, que en su forma móvil vive como comensal (amebiasis luminal) o como patógeno (amebiasis invasora) en la luz del colon, ocasionando inflamación, erosión y ulceración de la mucosa colónica, produciendo así un síndrome disentérico que puede cursar con anemia ferropénica.

Las infecciones parasitarias intestinales son una causa frecuente de eosinofilia; las uncinariasis y las esquistosomiasis aumentan de manera importante el número de eosinófilos y de forma masiva la estrongiloidiasis.

Adenopatías parasitarias

Las linfadenitis parasitarias se pueden encontrar como manifestación inicial de la tripanosomiasis, como presentación clínica común en leishmaniasis visceral o, muy frecuentemente, en la toxoplasmosis adquirida.

El diagnóstico diferencial entre la toxoplasmosis y otras enfermedades con un cuadro histológico semejante puede ser difícil y requerir un estudio clínico-patológico para su definición. Deben recordarse algunas patologías, tales como: la sarcoidosis, las micobacteriosis, la sífilis secundaria, la mononucleosis, la listeriosis, la brucelosis, el linfogranuloma inguinal, la enfermedad por arañazo de gato, las neoplasias ganglionares y la enfermedad de Hodgkin, además de algunas enfermedades granulomatosas. En el Capítulo 18 “Estudio integral de las adenopatías”, el lector encontrará otros alcances relacionados con el tema.

INFECCIONES BACTERIANAS

Bartonelosis

Una anemia hemolítica grave y aguda es producida por *Bartonella bacilliformis*, y es transmitida por el mosquito *Phlebotomus*. La bartonelosis existe especialmente en Perú, Ecuador y Colombia. La fase aguda de la enfermedad se conoce como “fiebre de Oroya” y la etapa crónica, con manifestaciones eruptivas de piel, corresponde a la “verruga peruana”. Ambas constituyen las dos fases de la enfermedad de Carrión.

Clostridios y otras bacterias

El *Clostridium perfringens* origina cuadros septicémicos después de abortos sépticos o por heridas traumáticas infectadas, los cuales pueden producir anemias hemolíticas graves. Los signos de hemólisis intravascular son prominentes y se encuentran numerosos microesferocitos.

Aproximadamente en el 40% de los casos de pacientes con septicemia por gérmenes patógenos, tanto gram negativos como gram positivos, se halla anemia hemolítica. En enfermos con cólera y en salmonelosis se ha observado hemólisis intravascular con hemoglobinuria.

Leptospirosis

Esta enfermedad bacteriana zoonótica tiene manifestaciones clínicas variables. El cuadro frecuente en individuos no provenientes de zonas endémicas es de fiebre repentina y cuadro “gripal” fuerte; pueden aparecer erupciones (exantema del paladar), anemia hemolítica, hemorragias en piel y mucosas, insuficiencia hepatorenal, ictericia, miocarditis y otras, que finalmente pueden llevar a un estado clínico grave. La gravedad, sin embargo, depende de las variedades serológicas de que se trate.

Dentro de las técnicas diagnósticas de laboratorio más utilizadas destacan IFA, ELISA, aglutinación látex y técnica de PCR. En la etapa aguda de la enfermedad suele observarse leucocitosis, elevación de las enzimas hepáticas y bilirrubinas, y puede presentarse anemia hemolítica, entre otras alteraciones. El tratamiento preventivo se hace con doxiciclina, y el específico con penicilina G, doxiciclina y amoxicilina.

Tuberculosis

M. tuberculosis puede producir anemia crónica, anemia hemolítica -en ocasiones Coombs positivas-, pancitopenia y reacciones leucemoides. Estas anemias son más comunes en tuberculosis miliar, aunque es posible que se presenten también en formas localizadas en pulmón. Los parásitos, al alojarse en los eritrocitos, pueden producir una anemia hemolítica leve o moderada y en algunos pacientes asplénicos pueden ocasionar la destrucción eritrocítica intravascular, causando hemoglobinuria con nefrosis tubular. La anemia hemolítica se produce por ataque directo del protozoo a la membrana eritrocitaria. Se ha descrito que este parásito, como el de la malaria, puede inducir la producción de anticuerpos antieritrocíticos, que favorecen la fagocitosis de los eritrocitos por parte de los macrófagos. En la sangre periférica se encontrará la parasitemia intraeritrocítica, que debe diferenciarse de la malaria por la morfología.

INFECCIONES VIRALES

SÍNDROMES DE MONONUCLEOSIS

Tanto en niños como en adultos, existen ciertos virus que están asociados a algunas alteraciones hematológicas, que van desde transitorias hasta permanentes, y cuyo espectro incluye, entre otros, anemia, leucopenia, neutropenia, linfopenia, trombocitopenia o pancitopenia. Las infecciones virales son la causa más común de linfocitosis transitorias caracterizadas, y algunas de ellas cursan con linfocitosis atípica. Varicela, paperas, citomegalovirus, hepatitis y el virus de Epstein-Barr están asociados con linfocitosis.

A continuación se describen las características más importantes asociadas a la mononucleosis infecciosa y los dos agentes causales más involucrados en esta: el virus Epstein-Barr y el citomegalovirus.

Virus de Epstein-Barr (EBV)

El virus Epstein-Barr (herpesvirus humano 5), descrito en 1964, es un virus ADN de doble banda, perteneciente a la familia *Herpetoviridae*, subfamilia *Gammaherpesvirinae*, y es el agente etiológico de la mononucleosis infecciosa.

El EBV infecta linfocitos B *in vitro*. Los linfocitos B no activados, que constituyen la población susceptible al virus en sangre periférica, una vez infectados sufren blastogénesis con aumento del tamaño del núcleo, del volumen citoplasmático y de la expresión de HLA-DR, así como de la expresión de nuevos antígenos de activación sobre la superficie celular. Por ejemplo, el CD23 se ha reportado como esencial para la immortalización. Después de 36 horas se inicia la síntesis de ADN y la división celular toma alrededor de 72 horas. Durante este tiempo se pueden detectar inmunoglobulinas en el citoplasma celular, predominantemente IgM, que luego son secretadas.

El EBV es un potente activador policlonal de la producción de inmunoglobulinas por parte de los linfocitos B. Dicha activación policlonal es independiente de células accesorias, tales como linfocitos T o macrófagos, y la immortalización, que es una de las características más importantes de la infección por EBV, es más un proceso permanente que transitorio. Una vez que inicia la producción del ADN, las células continúan proliferando como líneas celulares linfoblásticas, portando el genoma viral. El antígeno viral nuclear (EBNA) es expresado tempranamente, 12 horas post infección, y la expresión de genes virales en la mayoría de células infectadas es latente. Solo un bajo porcentaje de células infectadas entra en fase productiva, generando progenie viral y muerte celular.

El EBV se ha asociado a varias patologías; en algunas es el agente etiológico directo, mientras que en otras actúa como cofactor o factor desencadenante. Ejemplo de ellos son el síndrome linfoproliferativo asociado a X, los síndromes linfoproliferativos postrasplante, el carcinoma nasofaríngeo, la mononucleosis infecciosa, algunos linfomas como el Burkitt, entre otros. La mononucleosis infecciosa es el resultado de la infección primaria con el virus, mientras que el linfoma de Burkitt y el carcinoma nasofaríngeo ocurre en individuos seropositivos, como resultado de una serie de alteraciones de las células infectadas por el virus.

Mononucleosis infecciosa

La mononucleosis infecciosa es una enfermedad linfoproliferativa aguda y autolimitada, producto de la infección primaria por el EBV clásico y que se caracteriza por el aumento en los linfocitos y monocitos circulantes de incluso hasta más del 50%, con presencia de linfocitos atípicos en un porcentaje importante de ellos. El término "*mononucleosis-like syndrome*" se utiliza para describir cuadros semejantes al producido por EBV, pero que son producidos por el citomegalovirus (CMV).

Tiene un pico de mayor incidencia en adolescentes y adultos jóvenes (el 50% de las infecciones se da entre los 17 y 25 años), aunque en niños también tiene una alta incidencia. Su período de incubación se calcula que es entre 30 y 50 días.

La infección primaria ocurre vía oral, por contacto con individuos que se encuentren excretando virus en saliva. Se ha demostrado replicación viral en células epiteliales de cuello uterino y se ha detectado virus en semen, por lo que se sugiere que el virus también puede ser adquirido por contacto sexual. Ocasionalmente, se adquiere mediante transfusión sanguínea en individuos seronegativos, al igual que en pacientes trasplantados.

El EBV ingresa al cuerpo humano por vía oral e infecta las células epiteliales faríngeas. Los linfocitos B se infectan y se diseminan vía hematógena a otras partes del cuerpo, proceso durante el cual se produce la estimulación de respuestas inmunes humorales y celulares, aun previo al inicio de manifestaciones clínicas. Esto conlleva a la producción de anticuerpos contra los antígenos virales y linfocitosis de células T. Muchos de los síntomas del paciente son causados por una enérgica respuesta T.

Sintomatología

La mononucleosis infecciosa inicia con odinofagia, linfadenopatías generalizadas, pero de predominio en región cervical, así como síntomas inespecíficos como malestar general, astenia, adinamia, fatiga, anorexia, fiebre, sudoración, escalofríos, cefalea, brote cutáneo, mialgia, entre otros. En niños puede haber edema palpebral con o sin coloración violácea local, irritabilidad, etc. Otras manifestaciones clínicas incluyen halitosis, exudado amigdalino purulento severo, ictericia, hepatoesplenomegalia, dolor abdominal y otros. Menos frecuentes son aquellas manifestaciones del sistema nervioso central. Cabe resaltar que el virus EBV se ha relacionado también con el Síndrome de fatiga crónica en adultos.

En pacientes inmunosupresos como los trasplantados, pueden ocurrir manifestaciones gastrointestinales, así como signos de rechazo del órgano trasplantado, de enfermedad injerto versus huésped, desórdenes linfoproliferativos y linfomas.

Dentro de las complicaciones agudas más serias producidas por la infección por EBV destaca el síndrome de activación macrófaga, también llamado síndrome hemofagocítico o linfocitosis hemofagocítica. En este desorden inmunológico, caracterizado por una proliferación excesiva de histiocitos, se observa

la presencia de hemofagocitosis en sitios como la médula ósea, ganglios periféricos, sangre periférica, entre otros.

Hallazgos de laboratorio

El hallazgo principal de laboratorio en mononucleosis infecciosa es la aparición de células mononucleares atípicas en sangre periférica. Usualmente, el paciente presenta una leucocitosis en las dos primeras horas post infección, con conteos de leucocitos entre 12.000 y 25.000/ μ L, aunque en algunos casos puede observarse una reacción leucemoide. Del 60% al 90% de estas células son linfocitos y, por lo general, más del 20% de estos son atípicos. Hay linfocitos T activados respondiendo a los linfocitos B activados. Puede haber monocitosis transitoria, aunque el término mononucleosis se refiere a linfocitos y no a monocitos. Estos individuos pueden contar con neutropenia durante la primera semana de infección, así como plaquetopenia. Pueden encontrarse granulación tóxica y cuerpos de Döhle en los neutrófilos circulantes. El Coombs indirecto con frecuencia es positivo, pero la hemólisis es rara. Pueden presentarse anticuerpos antinucleares, así como aglutininas frías y crioaglutininas.

Los linfocitos atípicos son células más grandes que los linfocitos normales. Con la tinción de Giemsa muestran un citoplasma azulado pálido vacuolado y un núcleo elongado con cromatina nuclear gruesa, que puede estar colocado excéntricamente. Puede observarse hasta una mezcla de diferentes formas y tamaños e incluso semejar blastos. Aunque el EBV infecta linfocitos B, dichas células suelen estar presentes en número normal en sangre periférica en infección aguda.

Muchos pacientes infectados presentan elevación leve de las enzimas hepáticas por compromiso hepatocelular; estas usualmente se elevan durante la segunda y tercera semana de la enfermedad y retornan a la normalidad hacia la quinta semana. Puede ocurrir hiperbilirrubinemia hasta en un tercio de los pacientes.

La linfocitosis atípica en sangre periférica no es un hallazgo patognomónico de infección por EBV, ya que también puede verse en infección por citomegalovirus, hepatitis A, influenza B, rubéola, dengue y algunas infecciones bacterianas, entre otros.

Diagnóstico

El diagnóstico de mononucleosis se puede realizar en forma clínica ante la presencia de las manifestaciones antes mencionadas, así como la sospecha por el

hallazgo de linfocitos atípicos en sangre periférica. Sin embargo, el diagnóstico final se establece por medio de serología, demostrando anticuerpos específicos contra antígenos relacionados con el virus, básicamente anticuerpos contra los tres principales antígenos virales, EBNA (nuclear), VCA (de cápside) y EA (temprano). La presencia de anticuerpos IgM contra VCA, con o sin anticuerpos anti EA, es diagnóstica. Existen reactivos comerciales para la determinación, en especial por método de ELISA; no obstante, hay variaciones entre laboratorios y entre las diferentes casas comerciales productoras de dichos reactivos.

También se puede utilizar la determinación de anticuerpos heterófilos (anticuerpos generados por la estimulación policlonal) o prueba de Paul-Bunnell, tomando en cuenta que dicha prueba resulta claramente positiva solo durante un corto período de la enfermedad.

En la actualidad, la técnica de reacción en cadena de polimerasa es uno de los métodos más efectivos para un diagnóstico temprano, sobre todo en pacientes de alto riesgo, como los inmunosuprimidos, dentro de ellos los pacientes con neoplasias o los trasplantados.

Tratamiento

El tratamiento para la mononucleosis infecciosa por lo general es de tipo sintomático, y los agentes antivirales como el aciclovir o ganciclovir tienen indicaciones muy precisas en cierto tipo de pacientes o escenarios clínicos. Ejemplo de ello son los pacientes inmunosupresos y los trasplantados (pre o post trasplante). En algunos otros casos donde el EBV produce obstrucción de la vía aérea respiratoria superior, está indicado el uso de esteroides, aunque su uso sigue siendo controversial. Por lo demás, el tratamiento es fundamentalmente de soporte e incluye, entre otros, analgésicos y antipiréticos.

Desórdenes linfoproliferativos asociados a EBV

En personas trasplantadas con inmunosupresión concomitante la incidencia de malignidad es alta, y hasta un 20% puede desarrollar linfomas malignos. Los tumores tienden a ocurrir en el sistema nervioso central, tracto gastrointestinal u órganos trasplantados. Se ha demostrado claramente la presencia del genoma viral en células tumorales. Estos desórdenes proliferativos van desde la proliferación benigna de linfocitos B policlonales, hasta linfomas malignos de células B. Estudios serológicos en trasplantados muestran que alrededor del 50% de los linfomas asociados a EBV son producidos por infecciones primarias con el virus. El uso de terapia inmunosupresora impide la respuesta

celular mediada por células T, lo que permite que linfocitos B infectados por el virus proliferen.

Otros cuadros clínicos

El linfoma de Burkitt y el carcinoma nasofaríngeo son dos entidades clínicas endémicas, más frecuentes en África ecuatorial y China, respectivamente, en las cuales se ha documentado la presencia del EBV tanto por métodos serológicos como moleculares. En estos pacientes el EBV podría actuar como un factor desencadenante.

En pacientes VIH positivos, con leucoplaquia peluda oral, se ha demostrado ADN viral integrado y replicación viral del EBV en las células de las lesiones. De forma similar, se ha asociado al EBV en la patogénesis de la enfermedad de Hodgkin, donde las células malignas, incluyendo las células de Reed-Sternberg, contienen el genoma viral.

Citomegalovirus (CMV)

El citomegalovirus, virus perteneciente a la familia *Herpesviridae* (herpesvirus humano 4), subfamilia *Betaherpesvirinae*, infecta asintóticamente a la mayoría de los individuos durante la niñez, como resultado de la primoinfección; sin embargo, el virus puede producir reactivaciones o reinfecciones. No obstante, en recién nacidos o pacientes inmunocomprometidos, el CMV puede causar enfermedad severa, incluida la muerte. Puede producir infección en el feto y llevar al aborto en algunas ocasiones, o al cuadro clínico clásico de CMV congénito. El CMV es el agente más frecuente de sordera congénita en niños de etiología infecciosa, una de las causas más frecuentes de sordera en infantes pequeños. También, el CMV es el responsable de una alta morbilidad en niños o adultos trasplantados y en pacientes con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida).

La patogénesis de la enfermedad por CMV es compleja e involucra factores tanto del virus como del huésped. Desde el punto de vista hematológico, la infección por CMV produce hallazgos de laboratorio similares a aquellos producidos por EBV, linfocitos prominentes, con linfocitosis total y linfocitosis atípica. Las características inmunológicas, incluyendo el Coombs, aglutininas frías y crioaglutininas, son menos comunes en asociación a infección por CMV.

En la actualidad existen métodos de diagnóstico directos e indirectos para CMV. Ejemplos de estos son la serología específica, determinando anticuerpos de tipo IgG o IgM, presencia de antígenos virales en

los leucocitos de paciente (antigenemia), o bien, por métodos moleculares, donde el más conocido es la técnica de PCR. El método de cultivo celular viral, al igual que para EBV, es muy laborioso, razón por la cual se utilizan en pocos casos. Otros hallazgos indirectos que sugieren la presencia del virus son la observación visual de células grandes de inclusión en tejidos, de ahí su nombre.

Parvovirus B19 (PV B19)

El parvovirus que causa infección o enfermedad en humanos es el Parvovirus B19, el cual se ha asociado a eritema infeccioso, crisis o anemia aplásica, *hydrops fetalis*, entre otras formas de presentación. Perteneciente a la familia *Parvoviridae*, género *Erythrovirus*, y es un virus ADN banda simple, que solo se replica en células precursoras de eritrocitos humanos.

Cabe mencionar que para la replicación del parvovirus se requiere de células dividiéndose activamente. El PV B19 ataca la superficie celular mediante el antígeno P, el cual es endocitado y migra al núcleo donde se lleva a cabo la transcripción y la replicación del ADN. Las células precursoras eritroides son las células primarias y la médula ósea es el tejido primario para la replicación viral. La hematopoyesis extramedular realizada en el hígado fetal es un sitio importante de infección en el feto. Células eritroides con cromatina marginal e inclusiones nucleares son típicas de la infección por B19 y se encuentran durante la infección activa en médula ósea, sangre periférica y otros tejidos. El B19 también puede infectar tejido no eritroide, como células de miocardio, epidermales, precursores de granulocitos, megacariocitos y macrófagos.

En la mayoría de las poblaciones, la prevalencia de anticuerpos IgG contra el virus aumenta con la edad. La primoinfección ocurre en niños preescolares o escolares y se presenta como eritema infeccioso, aunque las infecciones subclínicas son frecuentes en niños, adolescentes y adultos. En niños pequeños la seroprevalencia es de alrededor del 5-10%, en adultos del 50% y en los ancianos que han tenido contacto con el virus más del 90%.

Los métodos de transmisión incluyen las secreciones del tracto respiratorio, exposición percutánea a sangre o hemoderivados y transmisión vertical de la madre hacia el feto. El virus ha sido encontrado en orina y sangre de pacientes durante la fase aguda de crisis aplásicas transitorias. El hecho de que el virus tarde meses en diseminarse entre escolares sugiere que la transmisión ocurre por contacto estrecho o incierto, si es a través de fómites.

La probabilidad de infectarse con el virus mediante una transfusión con una unidad de sangre es sumamente baja. Los pacientes con eritema infeccioso son más contagiosos en el pródromo de la enfermedad, mientras que los pacientes con anemia aplásica son infecciosos durante la enfermedad y semanas después de esta. El período de incubación promedio oscila entre 4 y 14 días, aunque se describe hasta los 21 días. Los pacientes inmunocomprometidos desarrollan infecciones crónicas y son potencialmente infecciosos por tiempo prolongado.

Eritema infeccioso

El eritema infeccioso o quinta enfermedad es la forma de presentación clínica sintomática más común del PV B19 y se manifiesta clásicamente por un brote eritematoso malar bilateral y un brote también “en encaje” en tronco y extremidades. Antes de la aparición del brote, el individuo puede presentar fiebre, cefalea, odinofagia, coriza, síntomas gastrointestinales, artralgias o artritis.

Desde el punto de vista hematológico, es probable encontrar en estos pacientes reticulocitopenia, anemia, linfocitopenia, neutropenia y trombocitopenia previo o posterior al brote.

Crisis aplásicas

La crisis aplásica transitoria es una de las presentaciones más interesantes producto de la infección por PV B19. La infección de los precursores de serie roja conlleva a disminución o detención de la hematopoyesis medular, lo cual en personas con necesidad de incrementar su eritropoyesis puede generar una anemia reticulocitopénica o crisis aplásica transitoria. Los pacientes presentan síntomas característicos de anemia severa y palidez, debilidad y letargia. Durante la fase aguda de la enfermedad los pacientes no tienen reticulocitos en sangre periférica y a menudo los niveles de hemoglobina pueden llegar a caer hasta en un 30% o más. La médula ósea es normal para la serie mieloide, pero ocurre hipoplasia o aplasia para la serie eritroide. La resolución de la enfermedad se confirma con un aumento de la reticulocitosis entre el día 7 y 10 después del inicio de síntomas. A diferencia de los síntomas del eritema infeccioso, la crisis aplásica ocurre durante la fase virémica de la infección y se resuelve cuando el paciente desarrolla una respuesta inmune contra el virus. La infección por PV B19 en niños o adultos puede evolucionar hacia cronicidad o incluso ocasionar la muerte en pacientes inmunosupresos.

Infección intrauterina e *Hydrops fetalis*

El PV B19 atraviesa la placenta y puede infectar al feto, produciendo así aborto, muerte fetal o *hydrops fetalis*. El feto tiene un alto volumen de eritrocitos, un alto recambio de estos y un sistema inmune inmaduro que no siempre puede controlar la infección viral. Por esta razón, la transmisión transplacentaria puede producir infección fetal crónica y anemia severa, la cual puede conllevar a insuficiencia cardíaca congestiva y muerte. El feto también puede sobrevivir a la infección sin evidencia de efectos a largo plazo. La infección materna en la segunda mitad del embarazo presenta menos riesgo para el feto, tal vez porque la transferencia transplacentaria de anticuerpos protege al feto.

Aproximadamente una tercera parte de las mujeres embarazadas infectadas contaminan al feto, y en ellos la tasa de mortalidad puede ser hasta del 10%. El diagnóstico en las embarazadas se puede realizar mediante determinación de anticuerpos IgM.

Otros cuadros

La complicación más común del eritema infeccioso es el compromiso articular, que si bien es cierto ocurre solo en el 10% de los casos en niños, en adultos puede ocurrir hasta en el 80% de los casos. En ellos son comunes las artralgias y la artritis. Esta condición por lo general se manifiesta por poliartropatía periférica simétrica en manos, muñecas, rodillas y pies, aunque cualquier articulación puede verse afectada. Los síntomas articulares pueden presentarse solos o en combinación con otros síntomas, antes, durante o después de la erupción. El grado de compromiso articular va desde artralgias leves hasta franca artritis, pero usualmente es transitorio y dura pocos días.

Otras complicaciones hematológicas asociadas a la infección por parvovirus B19 incluyen anemia hemolítica transitoria, púrpura trombocitopénica, púrpura de Henoch-Schönlein, anemia aplásica y neutropenia crónica.

Otras formas menos frecuentes de presentación incluyen encefalitis aguda, meningitis, miocarditis, síndrome de Guillain-Barré, parálisis facial, eritema multiforme, parotiditis, neumonía, etc. Se han reportado casos de infección crónica por B19 en pacientes con algunas vasculitis sistémicas, tales como granulomatosis de Wegener, poliarteritis nodosa y síndrome de Kawasaki.

Diagnóstico de laboratorio

El método diagnóstico de elección para infección por parvovirus B19 es la determinación de anticuerpos séricos IgM o IgG específicos. Los anticuerpos IgM se desarrollan a los 10-12 días después de la infección y están presentes en más del 90% de pacientes con eritema infeccioso al inicio de la erupción y en cerca del 80% de pacientes con crisis aplásica transitoria al momento de su presentación. En inmunosupresos pueden haber niveles indetectables de anticuerpos, razón por la cual en ellos la demostración del virus mediante técnica molecular de PCR es de mayor utilidad.

Tratamiento

No existe tratamiento antiviral específico para este agente y de hecho raramente se necesita tratamiento sintomático, aun en niños con eritema infeccioso. Para problemas articulares puede ser necesario el uso de analgésicos o antiinflamatorios. En casos de crisis aplásicas, la transfusión con glóbulos rojos empacados está indicada y mejora el pronóstico. Los pacientes inmunosupresos con infección crónica por PV B19 pueden tratarse con inmunoglobulina intravenosa (IGIV). El manejo y tratamiento de fetos infectados y mujeres embarazadas es controversial, y en algunos casos se han empleado las transfusiones sanguíneas intrauterinas; sin embargo, los riesgos y beneficios de esta modalidad terapéutica aún no han sido demostrados con claridad.

DENGUE

El dengue, la enfermedad viral transmitida por artrópodos de mayor importancia en el mundo en cuanto a mayor morbilidad y mortalidad, es causado por un virus perteneciente a la familia *Flaviviridae*. Específicamente, esta enfermedad es provocada por algunos de los cuatro serotipos del virus del dengue: DEN-1, DEN-2, DEN-3 y DEN-4; cualquiera de ellos puede generar enfermedad grave. Estos virus son esféricos, de tipo ARN (ácido ribonucleico), con un genoma de alrededor de 10.200 nucleótidos que codifican para tres proteínas estructurales (cápside, membrana y sobre) y siete proteínas no estructurales denominadas: NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b y NS5.

Epidemiología

Más de 2.5 billones de personas alrededor del mundo están en riesgo de sufrir la infección por dengue y en la actualidad más de un centenar de países tienen transmisión endémica de este. Existen diversas

razones por las cuales se ha producido un aumento en la reemergencia del dengue. Dentro de ellas, las razones demográficas y sociales, tales como el aumento en la población humana y la urbanización sin planeamiento son muy importantes. Con el incremento descontrolado en la urbanización mundial, que a su vez ha llevado a un hacinamiento en ciertas áreas del mundo, los sistemas de manejo de desechos sólidos se han vuelto insuficientes ante la magnitud de tal evento. De igual forma, el aumento en las migraciones de las personas entre países ha contribuido negativamente al alza en el número de casos. A su vez, el cambio climático y el sobrecalentamiento de la tierra, uno de los factores con mayor impacto, ha hecho que el mosquito transmisor del dengue se adapte a alturas que antes ni siquiera se contemplaban como aptas para su supervivencia. Por ejemplo, en Costa Rica durante la última década el dengue dejó de ser una enfermedad de la costa pacífica y atlántica y ya ocurren casos en todo el país. Aunque se presentan casos durante todo el año, el repunte de estos se da con las lluvias y las inundaciones secundarias.

Transmisión y manifestaciones clínicas

El virus del dengue es transmitido por la picadura del mosquito *Aedes aegypti*, el mismo agente vector transmisor de la fiebre amarilla. El período de incubación es de alrededor de cuatro a seis días. Las infecciones por dengue van desde asintomáticas hasta algunas con manifestaciones severas, que incluyen el dengue hemorrágico y el shock por dengue.

En general, las manifestaciones clínicas de la infección por este virus se dividen en dos grandes grupos: asintomáticas y sintomáticas. Con la primera existe el riesgo de contraer dengue hemorrágico o shock por dengue ante una segunda infección, aun cuando esto ocurre en una minoría de los pacientes. En el caso de las manifestaciones sintomáticas, puede ocurrir fiebre indiferenciada, clásico con o sin manifestaciones hemorrágicas, fiebre hemorrágica por dengue o síndrome de shock por dengue. En los infantes y niños pequeños, puede ocurrir únicamente una fiebre inespecífica acompañada o no de un brote maculopapular. En niños más grandes, en adolescentes o en adultos, la primoinfección puede presentarse solo como un cuadro febril aislado e indiferenciado o como el cuadro del dengue clásico. Este último se caracteriza por la presencia de fiebre, cefalea, mialgias, brote, fotofobia, náuseas y artralgia. Unos tres o cuatro días posteriores al inicio de la fiebre, y usualmente cuando cede la fiebre, el paciente puede presentar manifestaciones de sangrado, plaquetopenia, leucopenia con o sin neutropenia, y hemoconcentración. En casos más severos ocurre

shock, el cual se caracteriza clínicamente por la presencia de pulso débil y rápido, hipotensión arterial sistémica, mal llenado capilar distal, frialdad distal, piel marmórea, entre otros. La muerte ocurre alrededor del 5% y el 10% de estos pacientes, si no se instaura una terapia rápida y adecuada de resucitación con líquidos y electrolitos. El “*leak*” o fuga capilar es la principal característica en el dengue hemorrágico y el shock por dengue.

Dentro de la fisiopatología del dengue hemorrágico y el síndrome de shock por dengue, la infección secundaria por un serotipo diferente a este virus es el mayor factor de riesgo para su desarrollo. Esto lleva a la producción en el individuo de anticuerpos cruzados y linfocitos T de memoria. Una vez que el individuo sufre la infección por un serotipo distinto, la producción de complejos virus-anticuerpos produce la activación de la cascada del complemento y la infección de las células mononucleares por el virus, lo que genera lisis celular, liberación masiva de citoquinas y enzimas intracelulares, entre otras sustancias, con lo cual se produce una fuga capilar y el subsiguiente estado de shock.

Desde el punto de vista hematológico, las manifestaciones hemorrágicas que el dengue produce incluyen petequias, equimosis, gingivorragia, melena, hematemesis, aumento del flujo menstrual, sangrado por sitios de punción, shock por hemorragias y coagulación intravascular diseminada. Actualmente se considera que la prueba de torniquete positiva, que en el pasado fue considerada como fundamental en el abordaje diagnóstico de estos pacientes, posee ciertas limitaciones. En el caso del dengue hemorrágico, dentro de otros signos de alarma para el clínico, destacan el dolor abdominal intenso y persistente, vómitos constantes, cambio abrupto de la fiebre por hipotermia y manifestaciones del sistema nervioso central.

Diagnóstico

El diagnóstico radica principalmente en la sospecha clínica y en las pruebas de laboratorio. La sospecha clínica deber ser alta en pacientes de países como el nuestro, donde el dengue ya es endémico, o en viajeros provenientes de dichas zonas. El diagnóstico diferencial del dengue varía según el país, las enfermedades prevalentes en este y los grupos erarios. Sin embargo, deben considerarse, en general, las siguientes condiciones: fiebre amarilla, malaria, hantavirus, adenovirus, escarlatina, exantema súbito, monucleosis infecciosa, parvovirus B19, enfermedad de Kawasaki, leptospirosis, rickettsiosis, ehrlichiosis humana, síndrome de shock tóxico por

Staphylococcus aureus o *Streptococcus pyogenes*, fiebres hemorrágicas virales y otras enfermedades transmitidas por artrópodos.

Pruebas de laboratorio

•γ Serológicas

Al igual que otras infecciones, ante el primer contacto con el virus el individuo produce una elevación de la inmunoglobulina M (IgM). Seguidamente, hacia el final de la primera semana y hacia la segunda semana, se produce un aumento progresivo de la inmunoglobulina G (IgG). Si existe una segunda infección por el virus del dengue, los títulos de anticuerpos se elevan de forma más rápida, sobre todo después de las dos primeras semanas. Durante infecciones secundarias, pueden observarse falsos negativos de IgM. Hacia el quinto día de enfermedad, más del 75% de los pacientes tienen niveles detectables de IgM en suero, y para los días 6-10, 93-99% tienen IgM positivas que pueden persistir hasta por espacio de 90 días.

Dentro de los métodos serológicos utilizados para el diagnóstico del dengue, la prueba de ELISA es la de mayor importancia. Otros fluidos, aparte del suero, que han sido utilizados para el diagnóstico por técnicas de anticuerpos, incluyen la saliva. Todas estas técnicas de análisis serológico tienen mayor sensibilidad si las muestras del individuo son extraídas después de cinco días del inicio de los síntomas (fiebre, principalmente). Antes de este período no se recomienda tomar las muestras, puesto que ofrecen falsos negativos.

En un niño o adulto con sospecha clínica de infección por dengue, una IgM positiva sugiere infección actual o reciente. Sin embargo, el resultado debe interpretarse en el contexto epidemiológico y clínico adecuado, por cuanto esta prueba puede dar falsos positivos en otras enfermedades transmitidas por flavivirus, como la fiebre amarilla, la encefalitis de Saint Louis y la encefalitis japonesa. La seroconversión diagnóstica se define como un aumento de cuatro veces el valor de anticuerpos séricos.

Otras pruebas serológicas de menor impacto y utilidad para el diagnóstico del dengue incluyen la determinación de inmunoglobulina A (IgA).

•γ Cultivo viral y detección de antígenos

El período de viremia que produce el virus del dengue es corto; aparece entre dos y tres días antes del comienzo de la fiebre y se mantiene por cuatro a cinco días posteriores. Por esta razón, las muestras de sangre para aislamiento por cultivo viral deben

tomarse en dicho período. El suero es el fluido de primera elección para estos propósitos; no obstante, el virus puede detectarse de otros sitios como plasma, leucocitos, muestras titulares de hígado, bazo, pulmón, timo, nódulos linfáticos y otros sitios durante autopsias.

Como otros virus, este agente es termolábil, por lo que las muestras deben manipularse y transportarse al laboratorio lo más rápido posible. En caso de que las muestras deban permanecer almacenadas por largos períodos de tiempo, estas deben congelarse a -70 °C; de lo contrario, para períodos cortos con 4 °C es suficiente.

Para aislamiento por cultivo viral, el uso de líneas celulares de mosquito es la herramienta de mayor impacto. La identificación del virus se logra generalmente mediante el uso de las técnicas de inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales serotipo-específicos, aunque también suele utilizarse la citometría de flujo.

Otras técnicas de laboratorio empleadas en el diagnóstico del dengue son la inmunofluorescencia y el radioinmunoensayo; sin embargo, estas tienen poca sensibilidad y por eso no se utilizan de manera rutinaria para su diagnóstico.

• **Técnica de reacción de cadena de polimerasa (PCR)**

Durante los últimos años, la prueba de PCR se ha unido a las pruebas de laboratorio de utilidad en el diagnóstico del dengue. El ARN del virus se ha logrado detectar mediante esta técnica en suero, plasma, larvas del mosquito infectado, células infectadas, ciertos tejidos, entre otros.

Algunas ventajas que ofrece esta prueba, aparte de las ya conocidas para la técnica de PCR en general, incluyen la determinación del virus del dengue en muestras que han sido almacenadas por años y esto ha tenido gran importancia desde el punto de vista inmunológico y epidemiológico. Asimismo, con la PCR se ha logrado comprobar la presencia de múltiples serotipos infectando a un mismo paciente. De igual forma, en conjunto con el análisis de secuencia de nucleótidos, entre otros, se han podido clasificar los diferentes serotipos del virus en genotipos.

Tratamiento

El mejor tratamiento del dengue está enfocado sobre todo hacia su prevención. Desde el punto de vista de inmunizaciones, aunque en el quinquenio se ha avanzado mucho en ensayos clínicos de vacuna en

niños y adultos, aún no hay ninguna aprobada para la vacunación universal de los individuos. Se han probado diferentes vacunas en diversos grupos etarios de lugares como Asia, Europa y América Latina, principalmente, pero su inmunogenicidad ha sido variable.

En relación con el tratamiento médico como tal, no está indicado el uso de antivirales para estos pacientes; más bien, el manejo se enfoca en el tratamiento sintomático, la prevención de complicaciones hemorrágicas y el shock, la estabilización hemodinámica del paciente y la prevención de complicaciones.

En el manejo del shock, el uso de soluciones endovenosas como solución Dhaka y solución 90 son de fundamental importancia en Costa Rica y existen protocolos nacionales para el manejo de estos en los servicios de urgencias hospitalarios.

Medidas no farmacológicas de prevención del dengue incluyen el saneamiento ambiental, el control de vectores, la eliminación de criaderos, la educación en salud pública, el uso de insecticidas, entre otros.

INFECCIONES MICÓTICAS

Los hallazgos hematológicos son pocos y obedecen más bien a complicaciones de infecciones bacterianas agregadas o a diseminación del proceso micótico.

BIBLIOGRAFÍA

American Academy of Pediatrics. Parvovirus B19 (Erythema infectiosum, fifth disease). En: Pickering LK, Baker CJ, Kimberlin DW, Long SS (editores). Red Book 2012: Report of the Committee on Infectious Diseases. 29 ed. Elk Grove Village (IL): American Academy of Pediatrics; 2012. p. 539-541.

Andersson J. Epstein-Barr virus and Hodgkin's lymphoma. Herpes 2006; 13(1): 12-16.

Badilla-Umaña J, Ávila-Agüero ML, Canas-Coto A, Camacho-Badilla K, Sell-Marucco E, Sell-Salazar F. Neurocisticercosis en niños costarricenses: experiencia clínica e importancia de la vigilancia epidemiológica. Rev Neurol 2004; 39(6): 590-592.

Brathwaite Dick O, San Martín JL, Montoya RH, del Diego J, Zambrano B, Dayan GH. The history of dengue outbreaks in the Americas. Am J Trop Med Hyg 2012; 87(4): 584-593.

Carrillo J, Chinchilla M, Valverde B, Porras O, Mora L. Visceral leishmaniasis in Costa Rica: first case report. Clin Infect Dis 1999; 29(3): 678-679.

Cesarman E. How do viruses trick B cells into becoming lymphomas? Curr Opin Hematol 2014; 21(4): 358-368.

Díaz-Quijano FA, Waldman EA. Factors associated with dengue mortality in Latin America and the Caribbean, 1995-2009: an ecological study. *Am J Trop Med Hyg* 2012; 86(2): 328-334.

González A, Chaves LD, Vargas M, Cortes J, Ceciliano N, Mora A, *et al.* Hospitalizations due to abdominal angiostrongyliasis in Costa Rican children, a six-year study. En: 6th World Congress of the World Society for Pediatric Infectious Diseases (WSPID). Buenos Aires, Argentina. 18-22 de noviembre; 2009.

Iturrino-Monge R, Ávila-Agüero ML, Ávila-Agüero CR, Moya-Moya T, Cañas Coto A, Camacho Badilla K, *et al.* Seroprevalence of dengue virus antibodies in asymptomatic Costa Rican children, 2002-2003: a pilot study. *Rev Panam Salud Pública* 2006; 20(1): 39-43.

Junker AK. Epstein-Barr virus. *Pediatr Rev* 2005; 26(3): 79-85.

Parrow NL, Fleming RE, Minnick MF. Sequestration and scavenging of iron in infection. *Infect Immun.* 2013; 81(10): 3503-3514.

Periago MR, Guzmán MG. Dengue y dengue hemorrágico en las Américas. *Rev Panam Salud Pública* 2007; 21: 187-191.

Ruiz-Arguelles GJ. Fundamentos de hematología. 2 Ed. México, D.F.: Editorial Médica Panamericana; 1998.

Schneider E. Human parvoviruses. En: Long SS, Pickering LK, Prober CG (editores). Principles and practice of pediatric infectious diseases. 4 ed. China: Elsevier Saunders; 2012. p. 1087-1091.

Smets F, Sokal EM. Prevention and treatment for Epstein-Barr virus infection and related cancers. *Recent Results Cancer Res* 2014; 193: 173-190.

Srikiatkachorn A, Rothman AL, Gibbons RV, Sittisombut N, Malasit P, Ennis F, *et al.* Dengue-how best to classify it. *Clin Infect Dis* 2011; 53(6): 563-567.

Wong-McClure R, Suárez-Pérez M, Badilla-Vargas X. Estudio de la estacionalidad del dengue en la costa pacífica de Costa Rica (1999-2004). *Acta Med Costarric* 2007; 49: 38-41.

Whitehorn J, Simmons CP. The pathogenesis of dengue. *Vaccine* 2011; 29(42): 7221-7228.

Zuriaga MÁ, Blandón-Naranjo M, Valerio-Campos I, Salas R, Zeledón R, Barges MD. Molecular characterization of *Trypanosoma cruzi* and infection rate of the vector *Triatoma dimidiata* in Costa Rica. *Parasitol Res* 2012; 111(4):1615-1620.

CAMBIOS HEMATOLÓGICOS ETARIOS Y EN EL EMBARAZO

*Dra. Lidiette Salazar Palma
Dra. Kattia Valverde Muñoz*

CAMBIOS HEMATOLÓGICOS EN LA INFANCIA

Es un error considerar al niño como un adulto pequeño. El paciente pediátrico es totalmente diferente al adulto y, por ende, las variaciones y cambios que se presentan desde el punto de vista hematológico son muy distintas a las del adulto. Incluso, en la misma edad pediátrica se debe tomar en cuenta la edad del niño y el periodo de vida en el que este se encuentra, para su valoración.

La edad pediátrica se puede dividir en: periodo neonatal, periodo lactante, infancia y adolescencia. En cada uno de estos subgrupos se pueden encontrar variantes fisiológicas normales que deben ser consideradas al momento de evaluar un paciente.

En los siguientes apartados se analizarán las tres líneas hematológicas y los factores de la coagulación, con las variaciones propias de cada edad pediátrica.

Cambios fisiológicos de la serie roja

Desde que el bebé nace se enfrenta a una serie de cambios fisiológicos, biológicos y metabólicos, los cuales debe completar para poder sobrevivir extrauterinamente. No existe otro periodo en la vida de un paciente en donde el médico deba enfrentarse a tantas consideraciones e interpretaciones de aparentes alteraciones en los eritrocitos como en el periodo neonatal.

Los eritrocitos producidos por el feto humano son totalmente diferentes a aquellos producidos por los niños grandes. En el primer caso, se observa un aumento de la eritropoyetina en la fase mieloide y hepática de la eritropoyesis. De hecho, en el cordón umbilical de los pacientes prematuros no anémicos, la eritropoyetina se detecta en cantidades que son comparables, e incluso mayores, a las de los adultos. La eritropoyesis fetal solo es influenciada de manera parcial por factores maternos y es controlada principalmente por el feto.

El volumen de glóbulos rojos total aumenta en los diferentes periodos gestacionales y es mayor hacia el término. Luego del nacimiento, la velocidad de síntesis

de hemoglobina y la producción de glóbulos rojos disminuye dramáticamente (de dos a tres veces en los primeros días y en un factor de 10 en la primera semana de vida). Este cambio va de la mano con el incremento en el nivel de oxígeno en los tejidos.

Al momento del nacimiento, entre un 55% y un 65% del total de la síntesis de hemoglobina corresponde a hemoglobina fetal; luego ocurre un aumento de la hemoglobina A. La producción de glóbulos rojos y, por lo tanto, de hemoglobina, alcanza su mínimo en la segunda semana de vida; allí comienza a aumentar y alcanza su máximo a los tres meses de edad.

La vida media del glóbulo rojo de los niños de término es menor que la de los adultos, y la de los prematuros es todavía mucho menor. Cuanto más inmaduro es el recién nacido, existe una mayor reducción en la vida media.

La membrana del glóbulo rojo del neonato también difiere de la del adulto. Los glóbulos rojos de los neonatos son más resistentes a la lisis osmótica, ya que tienen una mayor concentración de miosina en la membrana. A la vez, son células que poseen un mayor volumen y una menor concentración de hemoglobina. Los reticulocitos neonatales también tienen un volumen mayor y una menor concentración de hemoglobina que el adulto.

La macrocitosis es más prominente en el prematuro y empieza a disminuir conforme aumenta la edad gestacional, muy probablemente en relación a la madurez en la función del bazo. Por ello, la morfología también varía; en el adulto el 78% de los glóbulos rojos tiene forma discoide, mientras que en el niño de término solo el 43% presenta esa forma. Estas características en la morfología dificultan el diagnóstico de patologías del glóbulo rojo al nacimiento. De hecho, existe una condición llamada "picnocirosis infantil", que es un desorden transitorio donde se observan múltiples alteraciones en la morfología.

Desde la perspectiva inmunológica, también la membrana del neonato es diferente. En el sistema ABO, los sitios del antígeno A, el antígeno A1 y el antígeno B son expresados débilmente; y en el sistema

li el antígeno I es débil o ausente.

tablas de valores normales para estas edades pediátricas (Cuadro N° 1).

Por todas esas variaciones es que se han elaborado

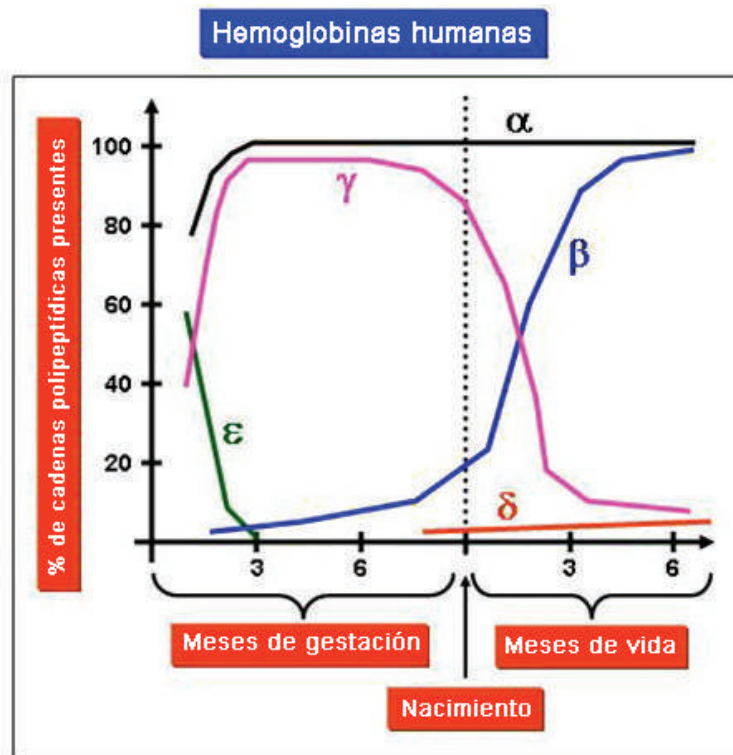


Figura N° 1. Hemoglobinas humanas.

Cuadro N° 1. Valores hematológicos normales en pediatría				
	Hemoglobina g/dL		Hematocrito	
Edad	Media	-2 DS	Media	-2 DS
Nacimiento	16,5	13,5	51	42
1 a 3 días	18,5	14,5	56	45
1 semana	17,5	13,5	54	42
2 semanas	16,5	12,5	51	39
1 mes	14,0	10,0	43	31
2 mes	11,5	9,0	35	28
3 a 6 meses	11,5	9,5	35	29
0,5 a 2 años	12,0	10,5	36	33
2 a 6 años	12,5	11,5	37	34
6 a 12 años	13,5	11,5	40	35
12 a 18 años femenino	14,0	12,0	41	36
masculino	15,5	13,5	43	37

En general, los valores de hemoglobina aumentan gradualmente hasta las 32 y 33 semanas de edad gestacional y se mantiene en un valor muy constante hasta el término; mientras que el volumen corpuscular medio y el total de reticulocitos disminuye lentamente hasta la gestación.

En el recién nacido sano no se presentan disminuciones de la hemoglobina en la primera semana de vida; sin embargo, en los neonatos de menos de 1.500 g puede disminuir entre 1 y 1,5 d/dL en este periodo.

Anemia fisiológica

Poco tiempo después del nacimiento, la eritropoyesis disminuye, con un aumento "excesivo" de glóbulos rojos. En los siguientes meses se da una disminución en los niveles hemoglobina, tanto en los niños de término como en los prematuros, y esto es lo que se conoce como "anemia fisiológica".

En los niños prematuros la disminución ocurre más rápido y es más severa, con los valores más bajos en las 4-8 semanas, comparado con los de término a las 10-12 semanas. Factores que determinan la severidad y el tiempo de presentación incluyen: peso al nacer, complicaciones neonatales, historia de transfusiones y deficiencias nutricionales de la madre. El nadir de la hemoglobina puede llegar a ser de 9,5 g/dL a los tres meses en niños de término y de 6 g/dL en seis a ocho semanas en niños prematuros.

La recuperación de esta anemia fisiológica está precedida por una discreta elevación del conteo de eritrocitos y posterior aumento de hemoglobina, lo cual continúa por el resto de la infancia.

Para mantener esta recuperación de la eritropoyesis de la anemia fisiológica, deben existir suficientes depósitos de hierro, que deben mantenerse con una adecuada dieta o con suplementos extras, como es la indispensable profilaxis del hierro en el paciente prematuro, cuyo rápido crecimiento hace que tenga requerimientos de hierro de 2 mg/kg/día. La anemia fisiológica de la infancia no responde al hierro oral, por lo que resulta importante correlacionar los niveles de hemoglobina de acuerdo a la edad del paciente, para definir si este realmente tiene anemia o no.

En la edad escolar el nivel de hemoglobina es muy estable; sin embargo, se debe tomar en cuenta que en los periodos de crecimiento acelerado, como a los dos años, cuatro años y en la adolescencia, el paciente debe tener una adecuada reserva de hierro y una buena fuente exógena en su dieta para evitar la carencia. Al llegar al periodo de la adolescencia se debe dividir el

nivel de hemoglobina por género, aspecto que va a depender del momento y de la edad de la menarca, ya que al presentarse un aumento en las pérdidas sanguíneas, los valores de varones y mujeres van a ser diferentes. En la actualidad, la menarca puede iniciar entre los 8 y los 10 años de edad. Al evaluar a este grupo etario, es fundamental consultar si ya la paciente tuvo su primera menstruación.

Cambios fisiológicos de la serie blanca

Durante los últimos tres meses de gestación, la médula ósea se convierte en el órgano clave para la formación de la sangre. La celularidad de la médula adquiere su pico máximo hacia las 30 semanas de edad gestacional; no obstante, el volumen medular ocupado por tejido hematopoyético continúa aumentando hasta el término del embarazo.

Luego del nacimiento, el tejido medular sigue aumentando, sin un aparente incremento en la concentración celular. Sin embargo, posnatal se nota un aumento en el número de leucocitos y de neutrófilos en sangre periférica.

Los neutrófilos y los granulocitos son la forma predominante de los leucocitos. El conteo total de neutrófilos, mejor expresado como neutrófilos absolutos más que porcentualmente, depende de la edad post-gestacional. En el caso de los granulocitos, estos se encuentran presentes de manera muy temprana en la vida del feto y constituyen la forma predominante de las células de la serie blanca circulante en el periodo neonatal.

El número de bandas y segmentados es mayor en los dos primeros días de vida del recién nacido. La evidencia sugiere que la maduración y el depósito de neutrófilos se encuentran disminuidos en los neonatos, lo que aumenta en ellos el riesgo de infección bacteriana. En ese mismo grupo de pacientes se ha demostrado que existe una reducción en la migración de los neutrófilos, así como una limitación en la capacidad fagocítica.

Los lactantes con infecciones bacterianas, particularmente septicemias, pueden tener un conteo normal de glóbulos blancos, pero con neutropenia absoluta y un aumento relativo en formas inmaduras como bandas. Este incremento en la proporción de bandas/segmentados es útil en el diagnóstico de septicemias por bacterias.

En cuanto a los linfocitos, se mantiene una linfocitosis que es normal hasta los cuatro o cinco años de edad, para luego virar y presentarse la distribución normal del adulto.

Cambios fisiológicos de las plaquetas y factores de la coagulación

El conteo plaquetario en el feto y en el neonato es el mismo que en los niños mayores, con el conteo inferior normal en $150.000/\text{mm}^3$. Diversas investigaciones han demostrado que la vida media plaquetaria es similar a la del adulto (9 días). Estudios *in vitro* revelan una disminución en la agregación plaquetaria de los neonatos; sin embargo, clínicamente este hallazgo no tiene ninguna relevancia, ya que el tiempo de sangrado en un neonato sano no varía con el del adulto.

En lo que respecta a todas las proteínas de la coagulación, algunas de estas dependen de síntesis hepática, lo que ocurre muy temprano en la vida del feto. Las concentraciones plasmáticas de la mayoría de las proteínas, así como los factores de la coagulación, están disminuidos en los niños de término, en comparación con los de más de un año de edad y luego en comparación con los adultos. Estos niveles se encuentran aún más bajos en los pretérmino. Los niveles de factores de vitamina K dependientes (II, VII, IX y X) y los factores de contacto (XI, XII, prekalicreina) se pueden encontrar solo entre el 10% y el 40% del nivel de los adultos. Asimismo, las proteínas trombolíticas: antitrombina III, proteína S y C, están presentes en el neonato en un 50% del nivel que se obtiene en la edad adulta. Por esta razón, se han desarrollado tablas de referencia de estos factores para los valores en los neonatos y en los pretérminos. Ya para el periodo de infancia y la adolescencia se tienen los mismos niveles que los del adulto.

CAMBIOS HEMATOLÓGICOS EN LA VEJEZ

La población mundial de adultos mayores y la expectativa de vida han ido en incremento. Por esta razón, es importante analizar los cambios hematológicos de la vejez; es decir, aquellos dependientes de la edad.

Conteo de leucocitos y diferencial

Hasta el momento no se ha establecido una variación en el diferencial ni en el conteo total de leucocitos en personas de edad adulta media. Al parecer, tampoco ocurren cambios notables en la vejez, y se podría afirmar que es posible observar un conteo normal de leucocitos y neutrófilos en personas de 90 años.

Algunos investigadores, sin embargo, han encontrado que después de los 65 años el conteo total de leucocitos tiende a disminuir en ambos sexos, condicionado principalmente por una baja en el conteo de linfocitos. Otros lo atribuyen a una disminución tanto de linfocitos como de granulocitos en las mujeres,

pero no en los hombres de 50 años. De igual forma, se ha reportado que el conteo absoluto de linfocitos no varía con la edad. Por lo tanto, se resume esto en una presentación cuantitativa variable.

Función linfocítica

Existe desacuerdo respecto a la proporción relativa de los linfocitos derivados del timo (linfocitos T) y los derivados de la médula (linfocitos B) en la sangre de jóvenes, respecto a la población con mayor edad. Así, en algunos estudios se indica que el porcentaje de células T y B no varían, mientras que en otros los B están aumentados y los T disminuidos.

Respuesta leucocitaria a las infecciones

Hay consenso en que en respuesta a infecciones el conteo de leucocitos no aumenta tanto en personas mayores, comparado con lo que sucede en la población joven; frecuentemente la principal manifestación de respuesta leucocitaria es un incremento en el número de neutrófilos en banda, con un conteo leucocitario normal. Sin embargo, en algunas series de casos de apendicitis aguda, la leucocitosis de los pacientes con más de 60 años fue la misma que la encontrada en pacientes jóvenes. A pesar de que la enfermedad estaba más avanzada en los mayores, los autores concluyeron que la leucocitosis generalmente refleja la severidad del proceso.

Por otra parte, en un estudio de respuesta leucocitaria a pirógenos, se encontró que el conteo total de leucocitos y neutrófilos aumentan mucho más lentamente en adultos mayores de 70 años que en adultos jóvenes; esto sugiere que en la vejez existe una disminuida reserva granulocítica medular.

Niveles de hemoglobina y otros parámetros eritrocitarios

Este parámetro sí varía con la edad: se ha demostrado que los niveles de hemoglobina bajan en el hombre después de la edad madura, a valores que oscilan entre 12,5 y 13,8 g/dl. En algunos estudios se encontraron niveles parecidos en personas de ambos sexos y de edad avanzada.

Los niveles de 2,3 DPG eritrocitario disminuyen con la edad; esta disminución es estadísticamente significativa, aunque solo produzca pequeños cambios en la afinidad por el oxígeno, por lo que su significado fisiológico aún no está claro.

La fragilidad osmótica se encuentra aumentada en individuos adultos mayores, en comparación con sujetos

jóvenes. Este fenómeno puede estar relacionado con el aumento en el VCM y la disminución en la CHCM que se observa en la población madura. El grado de hemólisis es más rápido en personas mayores, debido tal vez a alteraciones en la membrana eritrocitaria.

En la vejez el hierro sérico y la transferrina se encuentran ligeramente disminuidos, respecto a los encontrados en personas jóvenes. Así, es frecuente hallar valores que oscilan entre 50-70 pg/dl de hierro.

Se han encontrado niveles bajos de vitamina B₁₂ en una proporción significativa de personas de edad avanzada, sin que ocurra anemia y con una absorción de vitamina B₁₂ normal. El significado de estos hallazgos todavía no está claro.

Los folatos séricos y celulares se encuentran con frecuencia cercanos a los límites inferiores normales, sin presencia de anemia.

El VCM aumenta ligera y significativamente con la edad, aunque los tabaquistas pueden tener también un aumento en el VCM. Se ha reportado que personas adultas mayores y fumadoras pueden tener valores de VCM de 100 fl o más, en ausencia de una causa demostrable de anemia.

Plaquetas y fibrinógeno

No se han reportado cambios en el número de plaquetas dependientes de la edad, ni en personas de edad avanzada con enfermedades. Los niveles de fibrinógeno plasmático, por el contrario, sí aumentan con la edad, lo cual podría estar relacionado también con el incremento en la eritrosedimentación.

Patología hematológica en la vejez

Con la edad avanzada se presentan cambios hematológicos que reflejan patología, siendo la más frecuente y relevante la anemia de la vejez. En esta condición se presenta la anemia con características particulares, con diferencias en grupos raciales, con etiologías específicas y algunos mecanismos fisiopatológicos únicos de esta edad, de carácter carencial, por pérdida de sangre, por enfermedad crónica o hemólisis; en ocasiones se habla incluso de mecanismos inexplicables, a veces relacionados con alteraciones de las células madre.

Aunado a lo anterior, la polifarmacia en los adultos mayores puede causar interferencia de algunos fármacos en el metabolismo del ADN y provocar anemias megaloblásticas que no responden al tratamiento con vitamina B₁₂ y folatos.

Todo eso hace que la anemia en la vejez sea considerada un asunto de salud pública, de gran relevancia para el geriatra y para el hematólogo. Además, la variabilidad etiológica y epidemiológica obligan a estudiar e identificar condiciones de comorbilidad, historia medicamentosa, alimentaria y otras para el manejo de la anemia en este grupo poblacional.

Otra condición hematopatológica importante en la vejez es la creciente incidencia de mielodisplasia, en sus diferentes categorías, conforme aumenta la expectativa de vida. Comúnmente los pacientes se encuentran asintomáticos o asténicos, con mal estado general y solo se descubre la mielodisplasia al ser examinadas sus médulas óseas por infecciones a repetición o sangrados. En muchas ocasiones la mielodisplasia precede a procesos de leucemia aguda.

Existen otras malignidades y trastornos proliferativos que también son prevalentes en esta etapa de la vida, especialmente en hombres mayores de 50 años, como los síndromes linfoproliferativos crónicos (siendo el LLC el más frecuente); síndromes mieloproliferativos crónicos; leucemias agudas, principalmente mieloides; algunas formas de linfomas, en especial de tipo no Hodgkin; y patologías de células plasmáticas como mieloma múltiple y macroglobulinemia de Waldenström.

En cuanto a trastornos plaquetarios, se presentan algunas trombocitopenias de etiología periférica o medular, a veces metastásica; así como trombocitopatías y púrpuras vasculares de carácter y pronóstico benignos. Los medicamentos pueden condicionar o complicar estas patologías.

Es importante mencionar que en el adulto mayor se presentan con frecuencia accidentes tromboembólicos, primordialmente de carácter adquirido, favorecidos por el encamamiento o la postración en algunos pacientes; el riesgo mayor de estado protrombótico relacionado con cirugías en la edad avanzada y condicionado por el proceso aterosclerótico; los trastornos circulatorios y el deterioro vascular. Por tanto, debe descartarse un evento trombótico como signo inicial o durante el curso de algunas malignidades, como ocurre en ocasiones en edades más tempranas.

Asimismo, es frecuente en individuos añosos la aparición de anticoagulantes circulantes, ya sea espontáneamente, ligados a proceso inflamatorio crónico o en los síndromes linfoproliferativos. De igual forma, en esta etapa de la vida ocurren coagulopatías que pueden conducir a coagulación intravascular diseminada (CID), mediadas por infección, hepatopatía, malignidades y otras. Adicionalmente, en

las hepatopatías se altera la producción de factores de la coagulación, lo cual se suele acompañar por problemas de malabsorción o antibioticoterapia, que se manifiestan como episodios severos de sangrado.

CAMBIOS HEMATOLÓGICOS DEL EMBARAZO

Los cambios en los parámetros hemáticos durante la gestación normal, son la manifestación de un mecanismo materno protector de carácter fisiológico.

Plaquetas

Las plaquetas aumentan aproximadamente un tercio en número durante el embarazo, llegando a normalizarse de manera progresiva después del parto. De igual forma, durante la gestación se incrementa la adhesividad plaquetaria.

Por otro lado, algunas pacientes muestran una trombocitopenia leve, trombocitopenia gestacional, que generalmente no baja de 125.000/ μ l.

Leucocitos

Durante el embarazo aparece una ligera leucocitosis, con aumento de la neutrofilia al llegar el embarazo a término. Se ha observado que solo un 20% de las embarazadas normales presenta en el tercer trimestre más de 10.000 leucocitos por microlitro. Sin embargo, es interesante el hecho de que el 25% de los casos presentan mielocitos, metamielocitos y bandas en la sangre periférica, y que estas formas jóvenes fueron observadas con la misma frecuencia tanto en ausencia como en presencia de recuentos leucocitarios elevados. Se presume que la aparición de formas más jóvenes es una respuesta frecuente de la médula ósea en el embarazo normal y que carece de significado patológico.

Al comienzo del parto, es frecuente encontrar también una leucocitosis moderada.

Volumen plasmático

El volumen plasmático empieza a aumentar muy pronto durante el embarazo. En el primer trimestre se incrementa con relativa lentitud, pero este ritmo se acelera durante el segundo trimestre y se hace más lento durante el último trimestre. Por consiguiente, hay un aumento continuo del volumen plasmático en el curso del embarazo, el cual es alrededor de 1.000 ml en una gestación de un solo feto y de 1.500 en un embarazo gemelar.

No se sabe por qué aumenta el volumen plasmático, aunque se supone que la aldosterona y otras hormonas

esteroideas y no esteroideas, así como la placenta, actúan como una posible derivación arteriovenosa.

Durante la gestación los estrógenos están presentes en cantidades progresivamente crecientes y cuando se inyectan se observa que aumenta el volumen sanguíneo. Este incremento inducido por los estrógenos se asocia, probablemente, con un aumento en el volumen plasmático, ya que ellos ejercen un efecto depresor sobre la eritropoyesis.

Masa eritrocitaria total

Durante la gestación normal aumenta la masa eritrocitaria total, de modo que al llegar el embarazo a término, se observa un aumento aproximado de 300 ml. Los mecanismos que explican este incremento son, indudablemente, constantes. Por ejemplo, existe un aumento en la producción de la hormona eritropoyetina; sus valores cerca del tercer trimestre son alrededor del 30% al 35% más elevados que en las mujeres no gestantes y su actividad desciende intensamente después del parto. Aunque este incremento en la producción de eritropoyetina es tal vez el estímulo primario para el aumento de la eritropoyesis, no está claro cómo se eleva la producción de hormona.

Volumen total de sangre

Al haber un incremento en el volumen plasmático y en el volumen eritrocitario total durante la gestación, se produce un aumento sumatorio del volumen sanguíneo total. Este alcanza aproximadamente 1.300-1.600 ml para un embarazo de un solo feto y 400 ml adicionales para un embarazo gemelar. Si este aumento tan acentuado del volumen sanguíneo quedara confinado a la sangre circulante, representaría un gran esfuerzo para el corazón. No obstante, el aumento del tamaño del útero y las mamas junto con la hipertrofia de las venas pelvianas es suficiente para contener la mayor parte del volumen sanguíneo sobreañadido.

El aumento del volumen sanguíneo es de gran importancia fisiológica para cubrir en la madre las pérdidas de sangre durante el parto. Estas pérdidas alcanzan los 500 ml en un parto normal de un solo feto y 900 ml en los partos gemelares.

Inmediatamente después del parto, sube el líquido intersticial debido a un incremento en el volumen plasmático, y como consecuencia desciende el hematocrito. Alrededor del cuarto día desciende el volumen plasmático y aparece hemoconcentración.

Gracias al aumento del volumen sanguíneo, la mujer con gestación normal no complicada puede perder considerables cantidades de sangre sin graves

trastornos. Sin embargo, en la eclampsia existe hemoconcentración causada por disminución del volumen plasmático y esto sirve como índice de la gravedad del proceso. Como resultado de la reducción del volumen sanguíneo, estas pacientes presentan una especial sensibilidad al choque.

Anemia del embarazo

Teniendo en cuenta que el aumento del volumen plasmático es mayor que el incremento del volumen eritrocitario, en el embarazo normal se presenta una disminución del hematocrito de aproximadamente un 4% (de 40 a 36 ml/dl) y esto conduce a la llamada "anemia fisiológica de la gestación".

Dado que existen grandes variaciones en el aumento del volumen plasmático, se estima que en una gestación sometida a una buena dieta suplementaria con hierro, la baja concentración de hemoglobina o del hematocrito se presenta más a menudo con un volumen mayor de plasma que con una disminución de eritrocitos.

Empleando los criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS), se considera que existe anemia si el nivel de hemoglobina está por debajo del 11 g/dl en la mujer gestante.

Déficit de hierro durante el embarazo

La deficiencia de hierro es la causa más frecuente de anemia durante la gestación. Existen tres razones principales para este déficit:

- Muchas mujeres en edad fértil presentan un balance precario de hierro.
- Los cambios fisiológicos y físicos del embarazo requieren hierro extra.
- El feto necesita cierta cantidad de hierro para formar hemoglobina, mioglobina y algunas enzimas.

La gestación plantea demandas aumentadas de hierro: el feto requiere aproximadamente 75 ml/kg; la mayor parte la necesita en el último trimestre del embarazo. La placenta y el cordón umbilical también requieren alrededor de 75 ml de hierro, y quizás se pierden unos 150 ml durante el parto. El volumen sanguíneo y, principalmente, el volumen eritrocitario aumentan un 20% durante el embarazo, lo cual equivale a 200-600 ml de hierro (un promedio de 450 ml); por supuesto, este no se pierde, porque el volumen sanguíneo retorna a la normalidad dentro de las dos semanas siguientes al parto. Posteriormente, en la lactancia se invierten alrededor de 125 ml de hierro.

Por otra parte, cierta cantidad de hierro se economiza por la ausencia de menstruación durante nueve meses. Esta cantidad equivale más o menos a 100-150 ml (pérdida menstrual alrededor de 30 ml que equivale a 15 ml de hierro por nueve meses = 135 ml).

Las pérdidas netas de hierro en la gestación son muy variables; algunas mujeres casi no presentan déficit, mientras que otras pueden perder hasta 750 ml. Incluyendo el aumento del volumen eritrocítico, los requerimientos de la gestación son de 950 ml como promedio, con un costo neto aproximado de 500 ml de hierro, equivalentes a dos donaciones de sangre, cantidad fácilmente reemplazada en pocos meses con una dieta equilibrada. Mujeres con reservas deficientes de hierro no satisfacen estos requerimientos.

Una madre con escasos depósitos de hierro puede no aumentar el volumen eritrocítico, lo cual se reflejará en una anemia normocítica y normocrómica, y si el déficit es mayor, en una anemia hipocrómica y microcítica.

El feto tiene la máxima prioridad sobre el hierro disponible y a veces es capaz de acumular hierro por absorción trasplacentaria, incluso en casos de madres con déficit de hierro.

Generalmente, los suplementos de hierro pueden prevenir la anemia durante el embarazo. Una dosis diaria de 1-3 tabletas de sulfato ferroso puede satisfacer todos los requerimientos maternos y fetales, incluso en mujeres con anemia ferropénica, mientras el tratamiento se inicie por lo menos en el último trimestre de la gestación. El sulfato ferroso en su forma usual desecada y deshidratada se encuentra en tabletas de 0,2 g, que contiene cada una 60 mg de hierro elemental. Se administra una tableta tres veces al día después de las comidas, ya que así se tolera mejor, aunque la absorción sea un poco más eficiente con el estómago vacío. La absorción máxima total diaria es de 25% o 45 mg, lo cual permite la síntesis de la hemoglobina suficiente para 90 ml de sangre total.

Déficit de folato y vitamina B₁₂ en la gestación

En la síntesis de las nucleoproteínas, metabolismo de los aminoácidos y otras reacciones, el metabolismo del ácido fólico es vital para el desarrollo del feto. El suministro de folatos al feto tiene prioridad y no es sorprendente que el déficit de estos provoque algunos trastornos que afectan más a la madre que al feto. Los efectos adversos de esas deficiencias sobre el feto pueden condicionarse a las alteraciones secundarias al proceso clínico inducido en la madre.

Se ha comprobado que durante la gestación el folato sérico, que se acumula en la placenta, disminuye. La incidencia de folatos bajos en los últimos tiempos del embarazo varía en los estudios de población, pero suelen ser bastante elevados. Una causa podría ser que durante el embarazo aumentan las pérdidas urinarias, lo que podría disminuir el folato sérico, si su ritmo de reposición de los depósitos y dieta fueran lentos.

El folato de los eritrocitos también está más disminuido en la mujer gestante a término, que en las no gestantes. Esta observación es de esperar, partiendo del hecho de que los precursores eritrocíticos inmaduros obtienen su folato del plasma y que mantienen una gradiente a través de la pared celular.

En la mayor parte de los estudios efectuados, no se ha demostrado que el déficit de folato en el embarazo -no acompañado de intensa anemia- esté asociado con morbilidad materna, pero sí se asocia a patología fetal neurológica, en la carencia del folato de previo y al inicio del embarazo.

La deficiencia no se relaciona ni con hemorragias *ante partum* ni con toxemias. Parece que un leve déficit de folato es casi normal en muchos embarazos; este suele ser inocuo, autolimitado y fácil de prevenir con suplementos de folatos. Cabe resaltar que las madres con déficit de folatos son particularmente propensas a sufrir anemia megaloblástica durante la lactancia. Aunque no está clara la relación entre las infecciones urinarias y este tipo de anemia, varios informes indican la existencia de una asociación.

En cuanto al déficit de vitamina B₁₂ en el embarazo, su principal afectación se produce sobre el transporte y el metabolismo de los folatos, aunque el desarrollo del feto en ocasiones se ve muy perjudicado por el grave déficit de vitamina B₁₂ existente en la madre.

La concentración de vitamina B₁₂ en suero disminuye progresivamente durante el embarazo y retorna a la normalidad dentro de las primeras seis semanas después del parto. Los niveles séricos de un pequeño número de pacientes entran en los límites correspondientes a un déficit de vitamina B₁₂. Aunque en estas mujeres los niveles bajos no parecen relacionarse con síntomas patológicos, la anemia megaloblástica que poseen unas pocas puede deberse a una disponibilidad inadecuada de vitamina B₁₂ para el desarrollo de las células eritroides. En algunas pacientes, los bajos niveles de vitamina B₁₂ pudieran ser secundarios a un déficit de folatos.

Aunque los niveles séricos de vitamina B₁₂ pueden no reflejar el estado de los depósitos orgánicos, pudiera existir cierto déficit metabólico de vitamina B₁₂ en las pacientes con bajos niveles séricos, con independencia de los depósitos orgánicos de esta sustancia.

La frecuencia de la anemia megaloblástica de la gestación varía en las distintas poblaciones y depende, aparentemente, del estado nutricional de la población. La incidencia media citada en 17 estudios fue de 2,1% a 1,5%, pero la incidencia megaloblástica sintomática es tal vez mucho más baja.

En un 26% de casos estudiados se observaron leves anormalidades morfológicas en la médula ósea, consideradas como idénticas a las detectadas en la anemia megaloblástica franca. Las mujeres que consumen a diario carne, huevos o pescado y cuya dieta contiene periódicamente hígado, espinacas o riñones, solo en raras ocasiones desarrollan una anemia megaloblástica durante su embarazo (esta dieta podría contener alrededor de 200 mg de folato libre diarios).

El folato sérico y eritrocítico puede mantenerse por encima del límite considerado como deficitario y con una baja incidencia de anormalidades megaloblásticas o macrogranulocíticas en la médula ósea de la gestante a término, si recibe de 100 a 200 mg de ácido fólico diarios durante las 20 últimas semanas de la gestación. Es posible que suplementos menores puedan ser suficientes si el suministro de folatos conjugados es grande (por ejemplo, verduras) y que se requieran suplementos mayores cuando la ingesta es reducida. El esprúe, el embarazo gemelar, los parásitos intestinales y el paludismo aumentan las necesidades de folatos y pueden exigir un reajuste de estas cifras a un nivel superior.

La anemia grave en la gestación, sea megaloblástica o de otra etiología, puede constituir una amenaza para la vida de la madre, por lo que debe evitarse.

Anemia hipoplásica en el embarazo

La anemia hipoplásica en el embarazo suele ser el resultado de una nefropatía crónica o una infección grave. También existen informes en la literatura médica referentes a la existencia en el embarazo de una pancitopenia grave, poco frecuente, asociada con la administración de fármacos, posible insuficiencia pituitaria y timoma, así como pacientes con fallo medular idiopático.

Existen pruebas de que la gestación puede agudizar la pancitopenia de una infección, la insuficiencia

endocrina, la timoma u otra enfermedad idiopática; en unos pocos casos, agudiza la hipoplasia normal del embarazo y eleva los niveles de estrógenos, lo cual tiende a deprimir la producción de sangre.

Los niños suelen ser anémicos, trombocitopénicos y leucopénicos. El diagnóstico se realiza por exclusión de las causas conocidas productoras de depresión de la médula ósea. El tratamiento solo es de sostén, y si se controlan las complicaciones, sobre todo la pancitopenia, es posible que la gestación siga adelante hasta llegar al parto vaginal. Puede esperarse que casi un tercio de todas las pacientes presenten remisión después del parto y el pronóstico sea satisfactorio.

Complicaciones obstétricas asociadas con hemoglobinopatías

Durante los últimos tiempos, las anormalidades en la estructura y síntesis de la hemoglobina han sido consideradas en todo el mundo como una de las causas principales de morbilidad y mortalidad. Incluso, aunque se ha creído tradicionalmente que las hemoglobinopatías y las talasemias tenían una distribución racial y geográfica bastante circunscrita, los viajes y migraciones modernas han llevado los problemas asociados con estos síndromes a la atención del hematólogo en cualquier país. Es bien sabido que la anemia drepanocítica y la talasemia intermedia contribuyen a la morbilidad y mortalidad obstétricas.

Menos identificadas son las variantes de la anemia drepanocítica, de otras hemoglobinopatías o de talasemia menor. Sin embargo, estas últimas son de importancia particular, ya que en muchos casos la paciente ha sido asintomática y con frecuencia no se conoce que es la portadora de una discrasia sanguínea determinada genéticamente. Este tipo de paciente es el que presenta complicaciones inesperadas durante la gestación y el parto, subsanables con vigilancia obstétrica adecuada.

La mujer gestante que presenta un hematocrito menor de 30 ml/dl o que lo mantiene de manera persistente entre 30-33 ml/dl, a pesar de la administración de hierro y ácido fólico, necesita una evaluación ulterior con un flujograma por hemoglobinopatías. Un 90-95% de todas las pacientes con hemoglobinopatías o talasemias, pueden ser diagnosticadas de manera temprana, lo cual permite adoptar las medidas terapéuticas más adecuadas.

Por otra parte, es importante mencionar que las pacientes con anemia falciforme tienen características particulares, pues algunas fallecen jóvenes, presentan

un retraso en la menarquía y muestran menores tasas de reproducción en general. Además, el embarazo parece aumentar la frecuencia y gravedad de las crisis falciformes, por lo que la gestación en estas mujeres se asocia con un elevado grado de morbilidad materna y un grado muy alto de emaciación y pérdidas fetales. En ellas las infecciones, en general, son más comunes, en forma de infecciones pulmonares, del conducto urinario, osteomielitis, meningitis y otras. Las complicaciones pulmonares aparecen en un 40% de las gestantes enfermas y van desde el infarto pulmonar hasta las infecciones pulmonares recurrentes.

Los episodios sépticos en estas pacientes son particularmente graves, porque la fiebre y la acidosis asociada aceleran la deformación intravascular de los eritrocitos, y porque la autoesplenectomía asociada a la adultez disminuye mucho la resistencia frente al rápido desarrollo de un choque séptico irreversible.

En la enfermedad Hb C/C, la mortalidad materna asociada con el embarazo no parece estar aumentada; solo la mortalidad fetal (por emaciación) se encuentra ligeramente incrementada (15%). Las complicaciones maternas consisten en una elevación del grado de anemia, relacionada a menudo con un relativo déficit de ácido fólico y un claro aumento en el número y gravedad de las infecciones. Usualmente estas son infecciones pulmonares y de las vías urinarias. En algunos casos se ha observado una hemorragia post *partum* por atonía uterina. La esplenomegalia, más bien intensa, puede causar molestias abdominales en gestantes, pero esto raramente es una indicación para la esplenectomía.

En la talasemia mayor (β -talas, homocigota) muy pocas pacientes llegan a la edad de la menarquía, resultando infértiles y anovulatorias; los embarazos son infrecuentes y cursan con pérdidas fetales. En la talasemia intermedia y en la mayor, las pacientes se complican con eventos trombóticos, lo cual agrava la condición de la embarazada. Se requiere entonces terapia antitrombótica y un seguimiento más intenso.

En contraste con la intensa sintomatología asociada con la talasemia mayor, la paciente con β -talasemia menor a menudo desconoce su anormalidad y en la mayoría de los casos no es necesaria ninguna terapéutica. La gestación en ellas se complica sobre todo por un aumento en la severidad de la anemia, por lo general al inicio del tercer trimestre de embarazo. Excepcionalmente puede descender este nivel hasta los valores considerados como anemia intensa y requerir transfusiones para evitar complicaciones graves.

Por otra parte, la gestación en mujeres con β -talasemia menor puede evolucionar sin complicaciones. No hay pruebas de que disminuya la fertilidad, ni que aumente las pérdidas fetales. El parto suele ser normal y el peso medio del niño al nacer también. No parecen existir contraindicaciones para todo método quirúrgico y es posible emplear cualquier tipo de fármaco o dispositivo contraceptivo sin temor a un aumento en la incidencia de fenómenos tromboembólicos o de infección.

Con respecto a las alfa talasemias, la forma homocigota no es compatible con la vida. En el caso de la forma heterocigota, que es menor étnicamente (origen asiático) que la beta talasemia menor en nuestro medio, existen pocos datos disponibles sobre la gestación, pero el curso clínico es bastante similar al observado en la talasemia β .

En la enfermedad por HbH (α_4), la gestación suele complicarse con anemia grave, que a su vez es complicada por infección, inflamación o hemólisis que requiere múltiples transfusiones.

Trastornos inmunoematológicos en la gestación

Los trastornos inmunoematológicos en la gestación pueden clasificarse en aquellos procesos que afectan a la madre y al feto, y en los que solamente afectan al feto. Entre los primeros están la anemia hemolítica autoinmune y la púrpura trombocitopénica inmunológica. En estos trastornos el tratamiento agresivo con corticosteroides puede ser necesario para reducir el título de los anticuerpos circulantes y lograr el aclaramiento de las células recubiertas por los anticuerpos. La remisión de la enfermedad de la madre conduce a la remisión en el feto.

En el segundo tipo de casos, el principal trastorno es la incompatibilidad de grupo sanguíneo y la incompatibilidad Rh; además de la trombocitopenia neonatal, aunque con una incidencia mucho menor (1-2 por cada 10.000 nacimientos).

La prevención y el tratamiento de sostén son las principales armas terapéuticas disponibles. La inmunización pasiva con inmunoglobina anti-Rh ha reducido de manera notable la aparición de enfermedad hemolítica por incompatibilidad Rh, mientras que la incompatibilidad de grupo sanguíneo y la trombocitopenia neonatal isoimmune requieren la exanguinotransfusión del feto.

La IgG es la principal inmunoglobulina comprometida en esta patología, ya que es activamente transferida al feto y posee una zona biológica para la activación de complemento.

La identificación de problemas a futuro mediante análisis genéticos y moleculares de los grupos sanguíneos, grupo de plaquetas y grupo de leucocitos, constituyen importantes metodologías de prevención y manejo.

Problemas hemorrágicos y trombóticos en el embarazo

La hemorragia, el tromboembolismo, la toxemia y el aborto son los cuatro jinetes del apocalipsis materno. Mientras que los dos últimos son terrenos particulares del gineco-obstetra, los primeros tienen mayor interés para el hematólogo. Antes de la concepción, el impacto de los contraceptivos orales sobre las plaquetas, los factores e inhibidores de coagulación y su relación con la trombogénesis, son problemas importantes todavía no resueltos.

En el periodo neonatal, la hemorragia y la trombosis se localizan en el útero, especialmente en forma de hemorragia materna y de trombosis placentaria. Después del nacimiento la trombosis venosa domina las causas de morbilidad y mortabilidad.

Muchos factores asociados con la gestación pueden conducir al desarrollo de procesos tromboembólicos; por ejemplo, el aumento de la actividad del sistema de coagulación, el cual se manifiesta por un incremento en la actividad de los factores plasmáticos de la coagulación I, VII, VIII, IX y X, por un aumento de los anticuerpos anti-fosfolípidos plasmáticos y por un incremento en la adhesividad de las plaquetas.

Las mujeres embarazadas con lupus eritematoso sistémico parecen ser particularmente vulnerables a los efectos del anticoagulante lúpico en el síndrome primario o secundario. En ellas son comunes las trombosis de venas profundas, los abortos repetidos y la muerte intrauterina en el segundo o tercer trimestre, así como la muerte de fetos a término; todo eso como consecuencia de microtrombos placentarios, junto con otras alteraciones puramente obstétricas. El grado de pérdida fetal es muy alto, por lo que los embarazos que llegan a término espontáneamente son escasos. La reumatología moderna, en asocio con el obstetra que cuida estos embarazos, logran en la actualidad el mantenimiento saludable del embarazo de estas mujeres, con profilaxis antitrombótica específica, hasta lograr el nacimiento de sus hijos.

La disminución de la actividad del sistema fibrinolítico es otra condición que favorece los procesos trombóticos en el embarazo; esta se manifiesta en el laboratorio por una marcada disminución en los niveles de activadores del plasminógeno (t-PA), en

la actividad fibrinolítica, así como una disminución en los niveles del plasminógeno (se convierte menos en plasmina) y en los niveles de los inhibidores del sistema fibrinolítico (PAI), probablemente originados en la placenta.

Otras condiciones son: el aumento de la presión intraabdominal, las venas varicosas, la estasis, la comunicación arteriovenosa placentaria, la edad materna, la supresión de la lactancia mediante estrógenos, las cardiopatías, la cesárea y la obesidad.

Por lo tanto, no es sorprendente que haya un aumento en la incidencia de procesos tromboembólicos en la gestación, sobre todo en pacientes que guardan reposo, debido a complicaciones del embarazo y a condiciones trombofílicas no diagnosticadas que se manifiestan con el embarazo. Sin embargo, muchos otros casos aparecen en el postparto.

Para evitar daño al feto o durante la lactancia, debe escogerse la terapia específica, adecuada para el embarazo y el posparto: las heparinas de bajo peso molecular son las indicadas con excelentes resultados evitando abortos, óbitos y nuevos eventos tromboembólicos.

La aparición de trombocitopenia leve ofrece poco peligro para la madre, pero lo adquiere si disminuyen las plaquetas bajo 100.000/ μ l (moderada) o bajo 50.000/ μ l (severa), en casos de púrpura trombocitopénica inmune, por LES, por fármacos, por infecciones o síndromes microangiopáticos -incluido el HELLP-, que constituyen una amenaza muy grave para el feto y la madre.

Un tema muy importante en cuanto a hemorragia y a trombosis en la práctica obstétrica, es el problema no resuelto de los riesgos inherentes a los contraceptivos orales. Las graves consecuencias que pueden producir obliga a advertirlo a todos los médicos y a todas las mujeres que los ingieren sin el control debido.

Otros problemas hematológicos asociados con el parto son el desprendimiento prematuro de placenta, la retención del feto muerto, la embolia de líquido amniótico y el aborto séptico, que activan los sistemas de coagulación y fibrinolítico y frecuentemente conducen a coagulación intravascular y fibrinólisis.

BIBLIOGRAFÍA

Canalejo K, Tentoni J, Aixalá M, Jelen AM. Valores de referencia del hemograma en embarazadas, con tecnología actual. *Revista Bioquímica y Patología Clínica* 2007; 71(2): 52-54.

Greer I. Thrombosis in pregnancy: updates in diagnosis and management. *Hematology* 2012; 203-207.

Guralnik J, Ershler W, Schrier S, Picozzi V. Anemia in the elderly: a public health crisis in hematology. *Hematology* 2005; 528-532.

Lichtman M, Williams W. Hematología en el anciano. En: Williams W, Beutler E, Kipps TJ, Collier BS Casascelli C. Williams: hematología. 6 ed. Reimpresión. Capítulo 8. Madrid: Marbán Libros S.L.; 2007.

Lilleyman J, Hann I, Blanchette V. Pediatric hematology. 2 ed. London: Churchill Livingstone; 1999.

McMillan J, Feigin R, DeAngelis C, Jones MD (editores). Oski's pediatrics: principles and practices. 4 ed. Philadelphia: J.B. Lippincott Company; 2006.

Orkin S, Nathan D, Ginsburg D, Look T, Fisher D, Lux S. Nathan and Oski's hematology of infancy and childhood. 7 ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2009.

Pavord S, Hunt B. The obstetric hematology manual. Cambridge: Cambridge University Press; 2010.

Proytcheva, M. Bone marrow evaluation for pediatric patients. *Int J Lab Hematol* 2013; 35(3): 283-289.

Ruiz GJ. Fundamentos de hematología. 3 ed. México: Editorial Médica Panamericana; 2001.

Sáenz GF. Hematología analítica. 5 ed. San José, Costa Rica: EDNASSS; 2008.

Spencer F, Gore JM, Lessard D, Emery C, Pacifico L, Reed G, *et al.* Venous thromboembolism in the elderly: a community-based perspective. *Thromb Haemost* 2008; 100(5): 780-788.

Townsley D. Hematologic complications of pregnancy. *Seminars in Hematology* 2013; 50(3): 222-231.

Dr. Juan E. Richmond Navarro
Dr. German F. Sáenz Renault

INTRODUCCIÓN

Diversos órganos, como el timo, el bazo y los ganglios linfáticos, así como ciertos tejidos linfoides, se hallan implicados en la inmunopatología, en la repercusión de la respuesta inmune y en el hallazgo de adenopatías, por lo cual es importante conocer su función.

EL TIMO

El timo es un órgano linfático inmunitario que surge del endodermo y del ectodermo de la tercera bolsa faríngea y de la tercera hendidura branquial, respectivamente. Aparece desarrollado por completo en el tercer mes de gestación y continúa creciendo hasta la pubertad. Luego involuciona, atrofiándose de forma progresiva, y es reemplazado por tejido adiposo.

Los protimocitos migran de la médula ósea (MO) y entran al timo por los vasos que se encuentran en la unión corticomedular, para seguir cuatro etapas de maduración, pasando de la zona subcapsular a través de la corteza a la médula, hasta la circulación, como linfocitos T maduros. Durante la migración intratímica los timocitos proliferan y se diferencian, cambian su tamaño y expresan antígenos que indican diferenciación y receptores de interleuquinas.

El timo, después de ser poblado por células precursoras que provienen de la MO, se transforma en el sitio de maduración de los linfocitos T con especificidad de antígeno. Las células precursoras proliferan en el timo y desarrollan un proceso muy complejo de diferenciación que produce la selección de linfocitos T, que reconocen antígenos externos asociados a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). Las células que dejan el timo son tolerantes a los autoantígenos. Todo este proceso es dependiente de la interacción entre los linfocitos T en desarrollo y las células del estroma en el microambiente tímico.

La diferenciación y maduración de los linfocitos T en el timo conlleva los siguientes aspectos: regulación de la proliferación de las células precursoras, vías de proliferación del linfocito T, activación programada del rearreglo de los genes α , β , γ y δ del receptor del linfocito T, selección positiva para células T α/β que

pueden reconocer antígenos asociados al CMH y selección negativa de linfocitos con reactividad contra autoantígenos.

EL BAZO

Anatomía y función

En el adulto, el bazo tiene un peso promedio de 125 g, con una longitud de 11 a 12 cm, un ancho de 6 a 8 cm y un espesor de 3 a 4 cm. Su morfología es ovoide y está rodeado por una cápsula de tejido fibroso, fibras elásticas y músculo liso. La superficie más externa está formada por células mesoteliales.

Sus principales funciones son:

- γ Retener y fagocitar microorganismos.
- γ Remover partículas de la sangre.
- γ Producir citoquinas y anticuerpos.
- γ Proveer un sitio para hematopoyesis.
- γ Almacenar sangre.
- γ Regular el volumen sanguíneo.
- γ Aclaramiento de eritrocitos anormales con inclusiones intracelulares, como cuerpos de Heinz y cuerpos de Howell Jolly.

El bazo efectúa la remoción de bacterias en individuos en los que no se ha desarrollado una respuesta inmune; es 10-50 veces más eficiente que el hígado en el aclaramiento de bacterias no opsonizadas y es la primera línea de defensa contra bacterias transportadas por la sangre, principalmente las que tienen cápsulas de polisacáridos, como *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae*.

Este es un órgano muy vascularizado y actúa como un filtro sanguíneo. Está conformado por dos zonas, la pulpa roja y la pulpa blanca, las cuales son diferentes en su estructura y función. La **pulpa roja** funciona como filtro para remover cuerpos extraños y eritrocitos dañados o senescentes. Además, funciona como un sitio de depósito para hierro, eritrocitos y plaquetas, y un lugar de hematopoyesis, sobre todo durante el periodo fetal y neonatal. Alrededor del 30% de todas las plaquetas están depositadas en el bazo, específicamente en la pulpa roja, en equilibrio dinámico

con la cantidad circulante. Las plaquetas esplénicas se ponen en circulación de manera inmediata después de algún estrés o ante un aumento de adrenalina. Por lo general, el incremento transitorio de las plaquetas se acompaña de un aumento paralelo de la cantidad de factor VII.

La **pulpa blanca**, por su parte, se encuentra alrededor de las arteriolas centrales y está compuesta por un envoltorio linfoide periarterioar, los folículos y la zona marginal. Es el órgano linfoide secundario más grande del sistema inmune; contiene alrededor de una cuarta parte de los linfocitos y es el sitio donde se inicia la respuesta inmune contra antígenos transportados en la sangre.

Circulación esplénica del bazo

La sangre entra al bazo por el hilio esplénico, utilizando la arteria esplénica, la cual se divide en las arterias trabeculares, localizadas entre las trabéculas y que entran al parénquima esplénico. De las arterias trabeculares se originan ramas que forman pequeñas arteriolas; estas entran en la pulpa roja, donde se convierten en las arteriolas centrales y son rodeadas de tejido linfoide. Ramas más pequeñas de las arteriolas centrales alimentan los lechos vasculares de la pulpa blanca.

Cabe mencionar que los eritrocitos, en sus 300 kilómetros de tránsito, sufren cierto grado de reestructuración al ser filtrados en las hileras esplénicas. Al parecer, los reticulocitos soportan mejor el retraso del tránsito esplénico, tal vez debido a que su cubierta de transferrina los hace más “viscosos” que los eritrocitos maduros.

Por lo general, las inclusiones intracitoplasmáticas que quedan de los eritrocitos neoformados en los sinusoides de la médula son “arrancadas” del interior de la célula por los macrófagos esplénicos, sin detrimento de la integridad de la membrana de los eritrocitos, que se sella por sí misma. Estas inclusiones comprenden gránulos de hierro, precipitados de hemoglobina o de globina y fragmentos de ADN o todo el núcleo celular.

En el humano no hay reservas importantes de células rojas ni blancas en el bazo, aunque en algunos animales, como el perro, el caballo y el carnero, la contracción muscular de la cápsula esplénica eleva súbitamente el hematocrito periférico, a través de una “autotransfusión” de la reserva en la sangre esplénica.

Fisiopatología

Asplenia

La asplenia es la ausencia del bazo y puede ser congénita, funcional o quirúrgica por esplenectomía. El diagnóstico se confirma por ultrasonido o tomografía, falta de fijación esplénica de Tecnecio 99 o por microscopía de interferencia de contraste que demuestre un aumento de eritrocitos dañados.

•γ **Congénita** (Cuadro N° 1)

La asplenia congénita del bazo se debe sospechar en niños con infecciones invasivas por organismos capsulados o con malformaciones de corazón y heterotaxia, así como en aquellos con un aumento en el número de inclusiones eritrocitarias o cuerpos de Howell Jolly. Se puede presentar con tendencia familiar con un patrón autosómico recesivo, con frecuencia de 12% en series de revisión de casos.

•γ **Funcional**

La causa más frecuente de reducción en la función del bazo es la anemia de células falciformes, en la cual los infartos esplénicos repetidos originan una “*autoesplenectomía*”. También se han descrito defectos en la función del bazo en el recién nacido, en hipertensión portal, en lupus eritematoso sistémico, en enfermedades infiltrativas, en infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana, en el uso prolongado de nutrición parenteral y en enfermedad injerto contra huésped. La hemólisis crónica también puede ocasionar asplenia funcional, probablemente debido a que la eritrofagocitosis bloquea los macrófagos del bazo.

Cuadro N° 1. Síndromes asociados con asplenia congénita

- γ Asplenia con enfermedad cardíaca congénita (Síndrome de Ivermark).
- γ Asplenia familiar.
- γ Asplenia con quistes en hígado, riñón y páncreas.
- γ Asplenia con microgastria y acortamiento de extremidades.
- γ Trombocitopenia, asplenia y miosis (Síndrome de Stormorken).
- γ Fascies especial, retardo mental, baja talla y criptorquidia (Síndrome de Smith-Fineman-Myers).
- γ Deficiencia caudal y asplenia.

•γ **Quirúrgica**

Puede ocurrir cuando se remueve quirúrgicamente el bazo después de un trauma, por malignidades linfoides, en el manejo de la púrpura trombocitopénica inmune refractaria, en algunos casos de anemias hemolíticas autoinmunes y por aumento masivo como en osteopetrosis maligna.

En la actualidad, ante lesión por trauma se prefieren otros abordajes, como hemiesplenectomía y esplenectomía con autotrasplante de tejido esplénico.

Esplenomegalia

La esplenomegalia es el incremento en el tamaño del bazo, como consecuencia de algún proceso sistémico o propio del bazo (cuadros N° 2 y N° 3). Con frecuencia suele deberse a una respuesta reactiva de la pulpa blanca linfoide, como ocurre en infecciones por virus, o bien, por bacterias o parásitos. Se observa una hipertrofia del compartimiento esplénico de macrófagos cuando se le somete a una sobrecarga crónica de trabajo, por ejemplo, en una endocarditis bacteriana, en una tuberculosis miliar o en infección por Epstein-Barr, así como en las hemólisis crónicas. La hipertrofia del compartimento de macrófagos cargados de lípidos es la causante de la esplenomegalia de la lipidosis por enfermedades metabólicas, como se observa en la enfermedad de Niemann Pick, enfermedad de Gaucher y muchas otras mucopolisacaridosis. En el caso de la Enfermedad de Gaucher, se produce acumulo de glucocerebrósidos anormales en las células del sistema reticuloendotelial, que ocasionan esplenomegalia e hiperesplenismo.

Un agrandamiento del bazo acompañado de hepatomegalia y aumento de ganglios linfáticos se encuentra en las proliferaciones neoplásicas y en las enfermedades linfoproliferativas, así como en el proceso inflamatorio denominado síndrome de activación macrofágica.

Cabe destacar que la infiltración esplénica con elementos hematógenos es un dato común de los síndromes mieloproliferativos, sobre todo en la leucemia mieloide crónica y en la mielofibrosis con metaplasia mieloide.

El bazo puede regresar a formas anteriores a su desarrollo ontogénico y sufrir metaplasia por tejido mieloide hematopoyético, cuya consecuencia final es la hematopoyesis extramedular. La anemia hemolítica crónica grave, especialmente en la anemia de Cooley y en la osteopetrosis, constituye un estímulo para este tipo de hematopoyesis.

•γ **Esplenomegalia congestiva e idiopática**

La congestión vascular o esplenomegalia congestiva, se observa con mayor frecuencia por hipertensión portal (síndrome de Bantý) secundaria a cirrosis hepática, aunque también puede darse por obstrucciones de la vena porta o de la esplénica, por *cor pulmonale*, entre otras causas. En el caso de la esplenomegalia idiopática, tan importante en los neonatos que habitan en regiones tropicales, aparentemente, esta es causada por infección crónica de paludismo u otras infecciones endémicas.

Cuadro N° 2. Clasificación y causas de esplenomegalia	
Clasificación	Causas
Alteraciones linfáticas	•γ Reacciones a infecciones: mononucleosis infecciosa. •γ Reacciones o alteraciones del tejido conectivo: leucemias linfocíticas, linfomas.
Alteraciones de macrófagos/ histiocitos	•γ Reacciones a infecciones: endocarditis bacteriana, tuberculosis miliar, brucelosis, sífilis. •γ Hipertrofia por sobrecarga: anemia hemolítica crónica. •γ Lipidosis: enfermedad de Gaucher. •γ Alteraciones proliferativas: reticulosis medular histiocítica, Enfermedad de Letterer-Siwe. •γ Síndrome de activación macrofágica.

Cuadro N° 2. Clasificación y causas de esplenomegalia	
Clasificación	Causas
Alteraciones infiltrativas	•γ Mieloproliferativas: mielofibrosis primaria, leucemia mieloide crónica. •γ Hematopoyesis extramedular: anemia hemolítica crónica, osteopetrosis. •γ Amiloidosis.
Aumento de la presión de la vena esplénica (congestiva)	•γ Cirrosis hepática. •γ Trombosis de la vena porta, vena esplénica o vena hepática.

Cuadro N° 3. Causas frecuentes de esplenomegalia y sus interrelaciones	
Con hepatomegalia	Con linfadenopatía
•γ Cirrosis. •γ Insuficiencia cardíaca. •γ Hepatitis. •γ Enfermedad de Hodgkin. •γ Linfoma. •γ Mielofibrosis. •γ Osteopetrosis maligna. •γ Síndrome de activación macrofágica.	•γ Leucemia linfoblástica aguda. •γ Leucemia linfocítica crónica. •γ Linfoma esplénico. •γ Enfermedad de Graves. •γ Enfermedad de Hodgkin. •γ Mononucleosis infecciosa. •γ Sarcoidosis. •γ Macroglobulinemia de Waldenström.

En lo que respecta a la clínica, la esplenomegalia se asocia frecuentemente con un incremento en el volumen plasmático, lo que conlleva a pseudoanemia o anemia por dilución. Esta expansión plasmática se podría explicar por lo siguiente:

- γ El órgano agrandado requiere de un mayor volumen sanguíneo para llenar su espacio intravascular adicional.
- γ En condiciones donde la médula ósea posee una actividad eritropoyética reducida, no es posible mantener una relación normal entre masa eritrocítica y volumen plasmático; por lo que el volumen adicional requerido para la expansión sanguínea es previsto solo por aumento en el volumen plasmático, lo que condiciona la anemia por dilución.
- γ En la cirrosis y en la esplenomegalia tropical se presenta una alteración en las proteínas (hipoproteinemias), especialmente debido a un incremento en la presión oncótica coloidal, lo que provoca una expansión del volumen plasmático.
- γ En las discrasias sanguíneas, el aumento en el volumen plasmático es directamente proporcional al tamaño del bazo.

Bazos accesorios

Se pueden descubrir pequeños bazos accesorios (también llamados esplénulos) en el hilo esplénico, en el mesenterio, en la región de la cola del páncreas o en cualquier otro lado. En cerca del 10% de los individuos normales pueden crecer después de la esplenectomía y causa recaída del proceso hematológico por el cual se efectuó la operación; sin embargo, esto es raro. Puede haber esplenosis por la siembra de tejido en la cavidad peritoneal, como resultado de la rotura de la cápsula esplénica. Las células colonizan y maduran hasta ganglios de tejido esplénico implantado en las superficies serosas.

El bazo como una trampa

Se denomina **hiperesplenismo** al estado de hiperfunción del bazo, que se caracteriza por:

- a. Esplenomegalia
- b. Disminución variable de la celularidad hemática (con descenso de una o más líneas celulares): anemia, leucopenia y/o trombocitopenia.
- c. Médula ósea con celularidad normal o aumentada, como mecanismo compensatorio de la citopenia.

d. Corrección de la citopenia con la esplenectomía.

El hiperesplenismo se produce por acumulación de la celularidad sanguínea en el bazo o por aumento de su destrucción al estar recubiertos de anticuerpos. No toda esplenomegalia comienza con hiperesplenismo, pero sí todo hiperesplenismo cursa con esplenomegalia. Evidentemente, tras una esplenectomía el hiperesplenismo desaparece y se normalizan los valores de la hemoglobina, los leucocitos y las plaquetas.

Con poca frecuencia el hematocrito está reducido por debajo del 30% en el varón y del 35% en la mujer; por lo general, los granulocitos no descienden a menos de 2.000/ul y las plaquetas a niveles inferiores a 75.000/ul. El recuento de reticulocitos es ligeramente elevado (4-8%) y pueden aparecer plaquetas grandes en el frotis de sangre. La médula ósea es celular y la maduración de las células es normal. La tríada de esplenomegalia, pancitopenia leve y médula ósea hiperplasia, sin células anormales o atípicas, es característica del hiperesplenismo. Entre las causas más importantes de crecimiento del bazo e hiperesplenismo se encuentran hipertensión portal, infiltración esplénica y esplenomegalia inflamatoria y reactiva. Entre las causas de la hipertensión portal destacan la cirrosis nutricional, la hepatitis crónica activa, la hemocromatosis y otras formas de enfermedad hepática crónica. La esplenectomía produce como resultado una mejoría substancial en el recuento celular sanguíneo si el hiperesplenismo es el mecanismo de la citopenia. Si es necesario practicar una esplenectomía a causa de pancitopenia progresiva o de hemorragia relacionada con trombocitopenia en presencia de hipertensión portal, deben considerarse los procedimientos de derivación portal.

Puede sobrevenir hiperesplenismo en otras enfermedades en las cuales se produce esplenomegalia. En el linfoma, la leucemia crónica, la talasemia y otras enfermedades que provocan descenso de los recuentos de células sanguíneas, estas citopenias pueden empeorar como resultado de la esplenomegalia.

El volumen sanguíneo del bazo, normalmente alrededor de los 50 ml, puede aumentar tanto en ciertos estados de esplenomegalia, que llega a constituir el 25% del volumen sanguíneo total y hasta el 90% del compartimiento total de las plaquetas. Sin embargo, si las plaquetas se encuentran sin alteraciones, soportan bien esta distribución anormal. Estas salen de manera fácil de las hileras a los sinusoides esplénicos, en donde se les descubre temporalmente adheridas a la pared vascular, bañadas por el flujo sanguíneo, lo que les preserva su viabilidad. Si los granulocitos también son normales, soportan el secuestro en el bazo sin

sufrir daño. No obstante, los eritrocitos, dependientes de la glucólisis para su energía, sí son susceptibles de daño cuando pasan de forma repetida por las hileras esplénicas.

La rígida inelasticidad de las células drepanocíticas, de las células de la enfermedad por hemoglobina CC o de los cuerpos de Heinz de ciertas anemias hemolíticas, hacen que sean más fácilmente atrapables en el bazo, aun los propios eritrocitos de la esferocitosis hereditaria; esto se debe a que por sus altos requerimientos glucolíticos son muy sensibles a la eritroestasis, y el estímulo repetido al pasar por el medio esplénico les origina fragmentación de su membrana, por lo que adquieren su forma esferocítica y, por último, quedan atrapados y se lisan. Los estados de hemólisis crónica producen hipertrofia del bazo por sobrecarga, la cual a su vez actúa de manera recíproca, empeorando la hemólisis.

En la anemia de Cooley el bazo puede llegar a ser tan grande que los eritrocitos transfundidos no sobreviven lo suficiente para que el enfermo sea capaz de mantener niveles adecuados de hemoglobina. En estos casos, la esplenectomía es imperativa, ojalá con un trasplante de médula ósea. Si la gran esplenomegalia de los sujetos con mielofibrosis y metaplasia mieloide es la causante de la intolerabilidad de las transfusiones o de la hemorragia por trombocitopenia grave, puede ser útil la esplenectomía, incluso tomando en cuenta la insuficiencia de la médula.

El bazo y los anticuerpos

Los eritrocitos y las plaquetas cubiertas con anticuerpos, son tomados y destruidos de manera selectiva en el bazo. En la anemia hemolítica autoinmune y en la púrpura trombocitopénica inmune (PTI) el anticuerpo es de origen endógeno.

Durante el tránsito esplénico, los anticuerpos de las superficies celulares se adhieren a los macrófagos (reconocimiento por parte del macrófago de la Fc de la Ig unida a la célula), que son los causantes del daño y la destrucción celular. Todavía se discute si el autoanticuerpo es el que ocasiona la destrucción de los granulocitos en el bazo de pacientes con neutropenia esplénica o síndromes de Felty.

Cuando las células se ven más afectadas por los autoanticuerpos y se presentan en la circulación los fenómenos de aglutinación o daño de la membrana, mediado por el complemento, predomina la destrucción celular en sitios extraesplénicos.

La observación de que algunos sujetos adquieren remisiones permanentes después de la esplenectomía

con desaparición total de los autoanticuerpos, ha originado la hipótesis de que en estos casos el bazo es el principal o el único sitio de su síntesis. Si esto fuera cierto, la concentración de anticuerpos sería mucho mayor en el plasma esplénico, lo que originaría destrucción celular instantánea, con poca o ninguna evidencia de células cubiertas con anticuerpos en la circulación general. De hecho, la concentración de anticuerpos en el plasma podría ser baja en la circulación general, en comparación con la del bazo, y su identificación sería muy difícil. Estos fenómenos explicarían aquellos casos en los que las detecciones del laboratorio no han sido concluyentes.

Se han proporcionado datos directos de que las células esplénicas provenientes de bazos extirpados a pacientes con púrpura trombocitopénica idiopática (inmunitaria) sintetizan un anticuerpo antiplaquetario, que ocasiona destrucción de las plaquetas por los macrófagos del bazo.

Efectos hematológicos de la esplenectomía, de la atrofia esplénica o de la asplenia funcional

Se considera que existe atrofia o afuncionalidad esplénica cuando el bazo llega a poseer menos del 20% de su tamaño normal, lo que origina en sangre periférica un cuadro similar al de la esplenectomía. La atrofia esplénica se ve regularmente en la anemia drepanocítica y en la enfermedad celíaca, y menos frecuente en otros desórdenes intestinales y en la trombocitemia esencial. Los cambios eritrocíticos incluyen: presencia de cuerpos de Howell Jolly, de gránulos sideróticos, de siderocitos y de células en diana o codocitos. En algunos pacientes se observan también crenocitos, acantocitos y células irregularmente contraídas. Es usual una ligera reticulocitosis (3-4%) y ocasionales eritroblastos. La inducción de cuerpos de inclusión se ve positivizada en grado extremo, por lo que debe tenerse en mente la ausencia o disfuncionalidad esplénica ante este hecho. Debe recordarse que la presencia de estas inclusiones son un reflejo de la ausencia de la función de "picoteo" esplénico. En pacientes que sufren de anemias hemolíticas, talasemias y anemias sideroblásticas, se puede observar una mayor porción de eritrocitos que contienen gránulos sideróticos. El número de cuerpos de Howell Jolly es también variable y más marcado en condiciones caracterizadas por diseritropoyesis. Otras inclusiones eritrocíticas pueden ser prominentes en la post-esplenectomía. Se hallan Cuerpos de Heinz luego de daño oxidativo por drogas y en pacientes que tienen deficiencia de la G6PD o de hemoglobinas inestables. Precipitados de cadenas alfa se encuentran en beta talasemia y depósitos cristalinos de HbC en enfermedad por HbCC. Luego de la esplenectomía

hay una elevación en el cómputo de leucocitos. En la mayoría de los sujetos, una leucocitosis neutrofílica en el periodo inmediato postoperatorio es reemplazada luego por un significativo y permanente incremento tanto de linfocitos como de monocitos. Tras unas pocas semanas, el cómputo de neutrófilos retorna a los niveles normales. No es usual un ligero incremento de basófilos y eosinófilos. En respuesta a la infección, los pacientes esplenectomizados producen una leucocitosis mayor en relación con las personas con el bazo intacto, y a menudo hay una marcada desviación a la izquierda con presencia de mielocitos e incluso, de células más inmaduras. En el periodo inmediato postoperatorio, las plaquetas se elevan a un máximo, el cual suele ser menor de 1.000.000/ul, con un pico entre el séptimo y duodécimo día. Esta trombocitosis usualmente es transitoria, y valores cerca de lo normal se obtienen luego de uno a dos meses.

LOS GANGLIOS LINFÁTICOS

Los ganglios linfáticos o nódulos linfáticos son estructuras pequeñas (1-2 cm de diámetro), que forman parte del sistema inmunitario y se encuentran dispersos en el organismo, generalmente formando agregados en lugares donde convergen vasos sanguíneos y linfáticos, que drenan el espacio intersticial de los tejidos.

De acuerdo con su histología, los nódulos linfáticos se componen de tres compartimentos: la corteza, la paracorteza y la médula.

Anatomía y función

Los ganglios linfáticos actúan como filtro de la linfa, un líquido transparente que proviene de los fluidos intersticiales de la mayoría de los tejidos del cuerpo humano y que es conducido por una red de vasos linfáticos. Este sistema de circulación de linfa recolecta a su paso, por los sitios donde se generan respuestas inmunológicas contra la infección, antígenos, células presentadoras de antígenos (CPA) y mediadores de la inflamación.

La linfa fluye en varios sitios durante su trayecto, a través de nódulos linfáticos que contienen grandes cantidades de linfocitos, macrófagos y CPA. En general, los seres humanos poseen alrededor de 450 nódulos linfáticos, dentro de los cuales las CPA y los linfocitos se ponen en contacto para iniciar la respuesta inmunológica primaria. Las CPA presentan antígenos a los linfocitos, que se activan y entran en expansión clonal para producir nuevos linfocitos y células plasmáticas que secretan inmunoglobulinas al flujo de linfa. La respuesta inmunológica se realiza en el estroma especializado que guía y organiza las

interacciones entre los linfocitos y las CPA. Algunos antígenos se filtran y salen de la linfa para ser destruidos por los macrófagos.

Estructura

Un nódulo linfático es una masa de tejido fibrovascular con linfocitos, incluida en un vaso linfático dilatado. Esta estructura se forma durante el desarrollo embrionario; en esta etapa el endotelio linfático origina la cápsula y el sistema de senos y el tejido mesenquimal se diferencian en lóbulos.

Los nódulos linfáticos están compuestos por lóbulos linfoides rodeados por senos llenos de linfa y cubiertos por una cápsula. La linfa circula a través de los senos y alrededor de los lóbulos, lo cual permite que el lóbulo linfoide (unidad anatómica y funcional básica del nódulo linfático) esté colocado en el medio de la circulación que fluye con las CPA y mediadores y la circulación de linfocitos.

Los nódulos linfáticos más pequeños pueden contener pocos lóbulos o incluso solamente uno, mientras que los nódulos linfáticos grandes pueden contener una gran cantidad de lóbulos.

La estructura de los lóbulos define áreas separadas para linfocitos T (LT) y linfocitos B (LB), para que estos interactúen con las CPA y entren en expansión clonal. Los linfocitos B se anidan en los folículos primarios para interactuar con las células dendríticas foliculares (CDF); los LB estimulados proliferan dentro de los folículos y forman los centros germinales (folículos secundarios). Los LT anidan en la paracorteza y en la corteza interfolicular para interactuar con las células dendríticas (CD); los LT estimulados proliferan en la paracorteza y la engruesan, pero no producen estructuras semejantes a los centros germinales. Los LT y los LB circulan entre las dos áreas. Las células plasmáticas que se originan de los LB migran a las cuerdas medulares, donde maduran y secretan anticuerpos que son vertidos en la linfa.

Los linfocitos migran a la estructura reticular del lóbulo linfático, con la ayuda de las vénulas endoteliales altas (VEA) que conforman la vías de circulación. Las VEA están compuestas por células epiteliales cuboides altas, que poseen receptores que ligan los linfocitos intravasculares y facilitan su transmigración al lóbulo linfático. El reclutamiento de linfocitos en las VEA es regulado por actividad inflamatoria remota a través de mediadores de la inflamación como MCP e IL-8.

Cuadro N° 4. Principales condiciones que originan adenomegalias

Linfadenopatía debida a respuesta primaria inmune

I. Infecciones	a) Infecciones piógenas
	i) Engrandecimiento local de nódulos en áreas que drenan puertas de entrada de infecciones locales (ejemplo: furúnculos causados por estafilococos, infecciones orales).
	ii) Engrandecimiento generalizado de infecciones claramente insidiosas (ejemplo: septicemia por salmonella, endocarditis bacteriana).
	b) Infecciones virales
	i) Engrandecimiento local de nódulos que drenan puertas de entrada de la infección (ejemplo: fiebre escarlatina, linfogranuloma venéreo).
	ii) Linfadenopatía generalizada en infecciones sistémicas (ejemplo: mononucleosis infecciosa, rubéola, sarampión, hepatitis infecciosa, citomegalovirus, VIH).
	c) Tipos misceláneos de organismos
	i) Engrandecimiento local de nódulos que drenan puertas de entrada de la infección, tales como infecciones por estreptococos y sífilis primaria.
	ii) Adenopatía (ejemplo: sífilis secundaria, toxoplasmosis).

Cuadro N° 4. Principales condiciones que originan adenomegalias	
II. Linfadenopatía secundaria o de respuesta inmune a agentes no infecciosos	•γ Ejemplo: enfermedad del suero seguida de inyección de proteínas extrañas.
Linfadenopatías por organismos debida a infección primaria de un nódulo.	
•γ Infección piógena. El ejemplo clásico es el bubón de <i>Pasteurella pestis</i> , formación de abscesos más comunes por invasiones estafilocócicas. •γ Formación de granulomas. La infección por el bacilo tuberculoso u hongos tales como <i>Histoplasma capsulatum</i> dentro de los nódulos, a menudo resultan con formación de granulomas, así como hipertrofia; los organismos presentes son identificables en el granuloma la mayoría de las veces (frotis y cultivos).	
Evolución neoplásica o invasión de nódulos	
I. Enfermedad neoplásica primaria de nódulos	•γ Enfermedad de Hodgkin y linfomas no Hodgkin. •γ Leucemia linfocítica crónica, leucemias linfoblásticas agudas. •γ Otras enfermedades de nódulos neoplásicos, tales como linfoepitelioma.
II. Procesos neoplásicos secundarios que ocurren en los nódulos	•γ Leucemias mieloides: leucemias granulocíticas agudas, leucemia mieloide crónica. •γ Mielofibrosis idiopática con hematopoyesis extramedular, que produce engrandecimiento nodular linfático. •γ Carcinoma metastásico que produce engrandecimiento del nódulo linfático.
Enfermedades de causa desconocida, principalmente con engrandecimiento del nódulo linfático (usualmente generalizada)	
I. Enfermedades "autoinmunes" (quizás son resultado del reconocimiento inmunológico de los tejidos del paciente como tejido extraño). a. Lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide y otras enfermedades "vasculares del colágeno", sarcoidosis.	
II. Reacción a drogas a. Hidantoínas y químicos relacionados.	
III. Enfermedades misceláneas a. Formación de granulomas, como se observa en la sarcoidosis o en pacientes expuestos al berilio. b. Hiperplasia reactiva, como la del hipertiroidismo.	

Diagnóstico del paciente con adenopatías

En la práctica clínica, el médico que se enfrenta a un paciente con adenopatías empieza con el examen físico. Luego procede, con lógica intuición, a un diagnóstico diferencial bajo un criterio ordenadamente considerado de aquellas enfermedades que se sabe producen linfadenopatías (Cuadro N° 4). La probabilidad acerca de la presencia de una o más de las enfermedades bajo consideración se incrementa

conforme se encuentran otras evidencias que soportan aquellas particulares posibilidades.

La evidencia de adenopatía se obtiene por un estudio sistemático del paciente, que incluye varias pruebas de laboratorio, algunas de ellas especiales, como la biopsia por aspiración o del ganglio en sí. Como se mencionó, la investigación clínica se dirige primero hacia enfermedades "probables"; luego se hacen pruebas específicas para el diagnóstico de desórdenes

“posibles”, pero improbables. Las adenomegalias, que proveen el punto focal de un estudio diagnóstico en ciertos pacientes, ocurren en una gran variedad de enfermedades, con predominio de las inflamatorias y las infecciones. Es probable que las causas más comunes sean infecciones regionales, tales como dermatitis, faringitis, sinusitis, heridas infectadas y abscesos dentales. La linfadenopatía también ocurre en infecciones más serias, como tuberculosis, brucelosis, sífilis, linfogranuloma venéreo, VIH, infecciones nicóticas y tularemia o fiebre de los conejos.

El engrandecimiento de nódulos linfáticos puede ser producto de enfermedad del colágeno (lupus eritematoso discoide (LED), artritis), de la linfadenopatía inmunoblástica o de procesos neoplásicos, tales como carcinoma metastásico, leucemia crónica o aguda, linfoma de Hodgkin y de no Hodgkin. Dentro de las causas misceláneas se pueden mencionar la adenopatía como reacción inesperada a drogas o medicamentos, la sarcoidosis, el hipertiroidismo, el arañazo de gato, entre otros.

Como en cualquier otro problema diagnóstico, ante presencia de adenopatías, siempre es esencial una historia completa. Aun la edad del paciente es una información útil, en vista de que las infecciones sistémicas más benignas -como la mononucleosis infecciosa- son comunes en niños y adultos jóvenes y raras en personas de edad madura o viejas. Asimismo, tanto la duración de la adenopatía como la presencia o ausencia de varios síntomas ayudan a decidir cuáles de los posibles diagnósticos son más probables. El desarrollo reciente de adenopatía no excluye el considerar una neoplasia y la persistencia de engrandecimiento ganglionar por varios meses hace poco atractiva la existencia de una infección aguda. Síntomas localizados, tales como dolor y suavidad en el ganglio, y la evidencia de una inflamación asociada -como faringitis- favorece un estado infeccioso. Una historia de pérdida de peso, fiebre recurrente, sudoración nocturna y prurito, sugiere la presencia de enfermedad sistémica, casi siempre del grupo de los linfomas.

El examen físico, sobre todo de las características de los nódulos superficiales, por lo general da una información útil. La distribución, tamaño, consistencia y movilidad de los nódulos, así como la presencia o ausencia de suavidad, también son aspectos importantes.

Probablemente, la observación más relevante es si la adenopatía se encuentra generalizada o localizada. Si el compromiso es generalizado, la primera consideración será en torno a alguna enfermedad

sistémica (se descarta una adenitis regional). Si el compromiso estuviera localizado, no se excluye la existencia de enfermedad sistémica, pero la primera consideración será realizar una investigación cuidadosa por alguna enfermedad asociada, sea infecciosa o neoplásica, en el área drenada por los nódulos linfáticos engrandecidos.

En cualquier paciente con adenopatías, el tamaño de los nódulos linfáticos se debe estimar de manera cuidadosa y debe reportarse en centímetros más que en otra forma menos precisa. La estimación del tamaño de estos nódulos da información útil sobre la posible presencia de ciertas enfermedades. Por ejemplo, los nódulos del hipertiroidismo en raras ocasiones son mayores a un centímetro de diámetro; en el LED usualmente son de 1 a 3 cm; y en las enfermedades linfomatosas suelen ser muy grandes.

En el seguimiento del progreso de la enfermedad, cuando el paciente se halla bajo observación, es indispensable la estimación y la constancia del tamaño de los ganglios. La presencia de suavidad en un nódulo por lo general indica que hay infección presente; sin embargo, una marcada suavidad también ocurre en nódulos de algunos pacientes con otras enfermedades, particularmente en el Linfoma de Hodgkin. Nódulos fijados a la piel o a tejidos más profundos indican que la infección o la neoplasia han comprometido el área o entorno del ganglio. Tractos sinuosos o cicatrices sobre el área de la adenopatía sugiere fuertemente tuberculosis o enfermedad micótica. Un nódulo relativamente pequeño, que sea duro como piedra en consistencia, sugiere carcinoma metastásico; sin embargo nódulos extremadamente duros, que miden varios centímetros de diámetro, también ocurre con calcificación en sarcoma y en tuberculosis. En enfermedades del grupo linfomatoso los nódulos se caracterizan por ser moderadamente firmes, como de caucho, y algunas veces elásticos o flexibles, pero muchas excepciones pueden ocurrir. El contorno normal de forma de frijol de los nódulos se mantiene de manera más frecuente en procesos infecciosos que en neoplasia.

Otros detalles del examen físico también son importantes. Por ejemplo, el hallazgo de un foco de infección en un área anatómicamente relacionada con la adenopatía, por lo general enfoca el diagnóstico hacia una adenitis regional. La presencia de esplenomegalia y hepatomegalia sugiere algún proceso infeccioso generalizado o alguna enfermedad del grupo de los linfomas. Si el bazo es firme y se extiende a mitad del camino del nivel del ombligo o más abajo, es probable que el paciente tenga algún desorden crónico, del tipo de una enfermedad linfoproliferativa, más que

una infección aguda de las características de la mononucleosis o de la hepatitis viral.

Análisis de laboratorio

Algunas veces los exámenes de laboratorio establecen el diagnóstico de la adenopatía, y en otras oportunidades permite la exclusión de ciertas enfermedades como para no tenerlas más en consideración. El hemograma completo se impone; con este es posible el diagnóstico de leucemia, si está presente, así como de otras enfermedades del tipo de los síndromes de mononucleosis, al menos con carácter provisional, sea que se establezca o que se excluya. Un incremento de los granulocitos favorece infección bacteriana o linfoma de Hodgkin. Un aumento de los linfocitos estimulados (atípicos) enfoca el diagnóstico hacia síndromes de mononucleosis (toxoplasmosis, CMV, Epstein-Barr) y brucelosis. Una monocitosis sugiere linfoma de Hodgkin, tuberculosis o brucelosis. La presencia de anemia puede señalar que el paciente tiene una infección más allá del carácter localizado.

Otras pruebas pueden ser necesarias para establecer la etiología de la adenopatía.

Algoritmo para el enfoque diagnóstico

Con la finalidad de enfocar una investigación clínica de las linfadenopatía en una forma convencional pero científica, se muestra un algoritmo diseñado por Greenfiel y Jordan, el cual se describe *in extenso*. Tal y como se ha expuesto, hay muchas enfermedades en las que pueden encontrarse ganglios linfáticos aumentados de tamaño, como reacción o un proceso inflamatorio local o asociados a una enfermedad sistémica, cuyo foco central no está en el sistema linfático. En algunos pacientes, la aparición de ganglios linfáticos aumentados de tamaño es la manifestación inicial o más aparente de la enfermedad que se presente y constituye el punto de partida para una investigación. El algoritmo que aquí se presenta ofrece unas directrices para la valoración del aumento de tamaño de los ganglios linfáticos, tanto de tipo primario como secundario (Figura N° 1).

El algoritmo se ha diseñado para aplicarse únicamente a adolescentes y adultos, ya que las enfermedades que ocasionan aumento de tamaño de los ganglios linfáticos en los lactantes y niños son distintas. No incluye el tratamiento de ninguna de las enfermedades causales. Siguiendo el modelo de protocolos o algoritmos clínicos para la asistencia primaria, tampoco incluye una valoración diagnóstica de las enfermedades poco comunes. En cambio, se incluyen datos inespecíficos para hacer que el lector

tenga en cuenta la posibilidad de otras enfermedades más infrecuentes y para que no abandone de forma prematura una línea de investigación. El algoritmo va orientado fundamentalmente a los pacientes ambulatorios y no al estudio de ganglios que aparecen en pacientes que ya están diagnosticados de una enfermedad grave o crónica. Se refiere tan solo a los ganglios periféricos confirmados por el médico a la palpación y no a los que se detectan por rayos X, como los ganglios hiliares.

El algoritmo corresponde a los principios de análisis de decisión. El orden de las pruebas sucesivas en el algoritmo se basa en la estimación de la máxima probabilidad de detectar una enfermedad, dada la información ya recogida, combinada con la importancia de su detección, las consecuencias desfavorables de un retraso y el mínimo de gastos, tiempo, riesgo e inconvenientes de la prueba para el paciente. La logística y la economía del ejercicio médico a veces no permiten que se siga ordenadamente una pauta temporal; se empieza por la prueba más productiva hasta la menos productiva. Así, por ejemplo, puede ser necesario solicitar de forma simultánea una extensión para la mononucleosis y unas pruebas serológicas para citomegalovirus y toxoplasma, en vez de esperar a los resultados del frotis inicial que corresponde a la enfermedad de mayor prevalencia.

Cabe destacar que el aumento de tamaño de los ganglios linfáticos que requiere ser estudiado, es cuando hay presencia de uno o más ganglios de 1 cm o más de diámetro, que no se habían apreciado antes y de los que no se conocía una causa previamente identificada. La presencia de múltiples ganglios pequeños puede hacer también necesaria la investigación. Dada la falta de precisión de los datos clínicos y la conocida dificultad de distinguir los ganglios que requieren una investigación de los que son solo aparentes, no se define con mayor precisión cuáles son los ganglios que deben considerarse como de importante tamaño.

Etapas iniciales

La investigación se organiza según la localización y la distribución de las adenopatías. El atributo de dolor a la palpación no distingue de modo adecuado las adenopatías de origen infeccioso de las que debidas a otras causas, como el linfoma de Hodgkin. La Figura N° 1 presenta la investigación inicial según el lugar donde aparecen los ganglios.

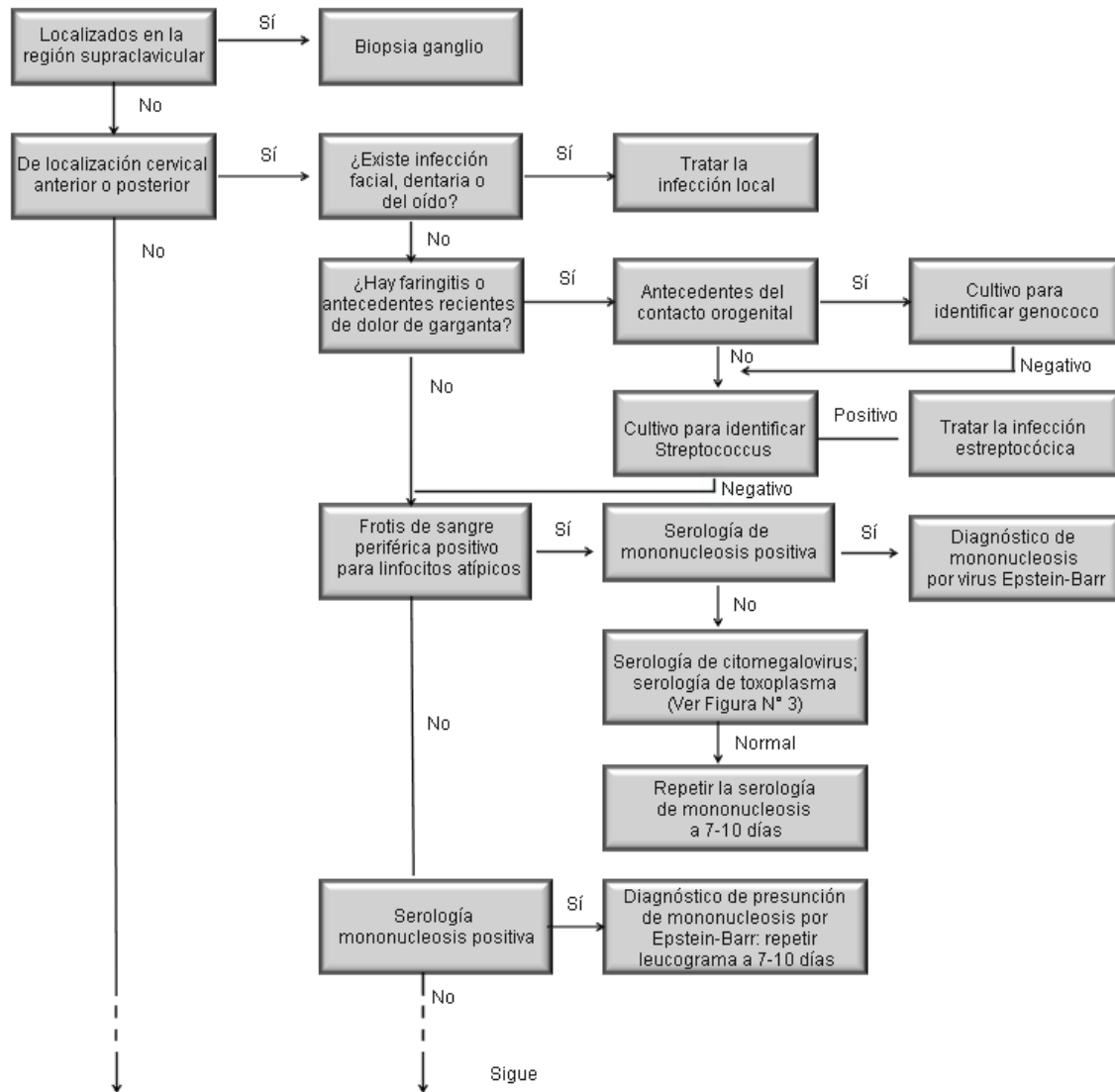


Figura N° 1. Pasos iniciales para la valoración de adenopatías localizadas.

Los ganglios supraclaviculares palpables suelen ser causados por tumores en un foco a distancia, y deben ser biopsiados. Pueden haber ganglios exclusivamente en la región cervical, secundarios a infecciones inaparentes. Una infección en fase de curación en la cara, una otitis externa sin dolor o un absceso dentario que no se acompaña de dolor o tumefacción local, pueden ser algunas de las causas por las que aparecen los ganglios. Hay que pensar en una faringitis gonocócica si hubo contactos urogenitales recientes.

Si no se halla ninguna infección facial, dentaria, de faringe u ótico, hay que pensar en la posibilidad de una afección del tipo de la mononucleosis. Muchos pacientes con cuadros parecidos a la mononucleosis presentan características clínicas atípicas, con una linfadenopatía localizada, y a menudo se les hospitaliza para realizar múltiples exploraciones que

son innecesarias y peligrosas. Estos cuadros pueden ser difíciles de diagnosticar, ya que cuando se observa por primera vez al paciente no siempre se encuentran las alteraciones características de las pruebas de laboratorio. Así, por ejemplo, es posible que la linfocitosis relativa con células atípicas no aparezca durante las primeras tres semanas de enfermedad, y las pruebas de aglutinación heterófila a veces no se positivizan hasta muy tarde en la evolución de la enfermedad, salvo que se utilicen las pruebas anticápside IgG e IgM del virus Epstein-Barr (EBV). Cuando las pruebas para EBV dan negativas, debe pensarse en el citomegalovirus o en la toxoplasmosis y debe llegarse al diagnóstico mediante una investigación serológica. Sin embargo, es más fácil empezar con un frotis de sangre periférica. Si se observa un 10% o más de linfocitos atípicos y los datos serológicos de mononucleosis son negativos, hay que pensar en

los síntomas de mononucleosis heterófilo-negativos producidos por el citomegalovirus o el toxoplasma.

Si no se descubre ningún síndrome análogo a la mononucleosis y el paciente presenta una reacción tóxica, debe emprenderse una investigación más extensa, como muestra la Figura N° 2. Pero si el paciente no presenta una reacción tóxica, bastará la observación y una nueva valoración a los siete o diez días. Si entonces persisten los ganglios, deben iniciarse nuevas exploraciones diagnósticas. La localización de ganglios linfáticos aumentados de tamaño en la axila, presenta un espectro distinto de posibles patologías locales. Aquí hay que pensar en la fiebre del arañazo de gato (*cat-scratch fever*), la esporotricosis, la tularemia, las infecciones estafilocócicas y estreptocócicas y el linfoma de Hodgkin o no Hodgkin. Pueden haber tumores de la extremidad o, con más frecuencia, de la mama, que pasan inadvertidos y cuya presencia viene anunciada por la aparición de unas adenopatías

axilares. Es menos frecuente que en la toxoplasmosis y la infección por citomegalovirus haya ganglios axilares y no es necesario realizar pruebas para descartar estas enfermedades, a menos que el paciente presente signos de una enfermedad sistémica activa. Por lo señalado, si el ganglio persiste sin que haya una causa local, es evidente que se deben biopsiar.

Con respecto a los ganglios localizados en el área inguinal, con un examen cuidadoso de los pies, las piernas y las regiones inguinal y genital, se pueden descubrir infecciones locales no observadas por el paciente. La sífilis, el linfogranuloma venéreo, el herpes genital, el melanoma maligno y otros tumores pueden manifestarse por el descubrimiento accidental del propio paciente o por el médico, a través de un ganglio linfático aumentado de tamaño. Dado que en ocasiones no se encuentra ninguna lesión en genitales en el mismo momento en que una infección de linfogranuloma da lugar a un aumento de tamaño

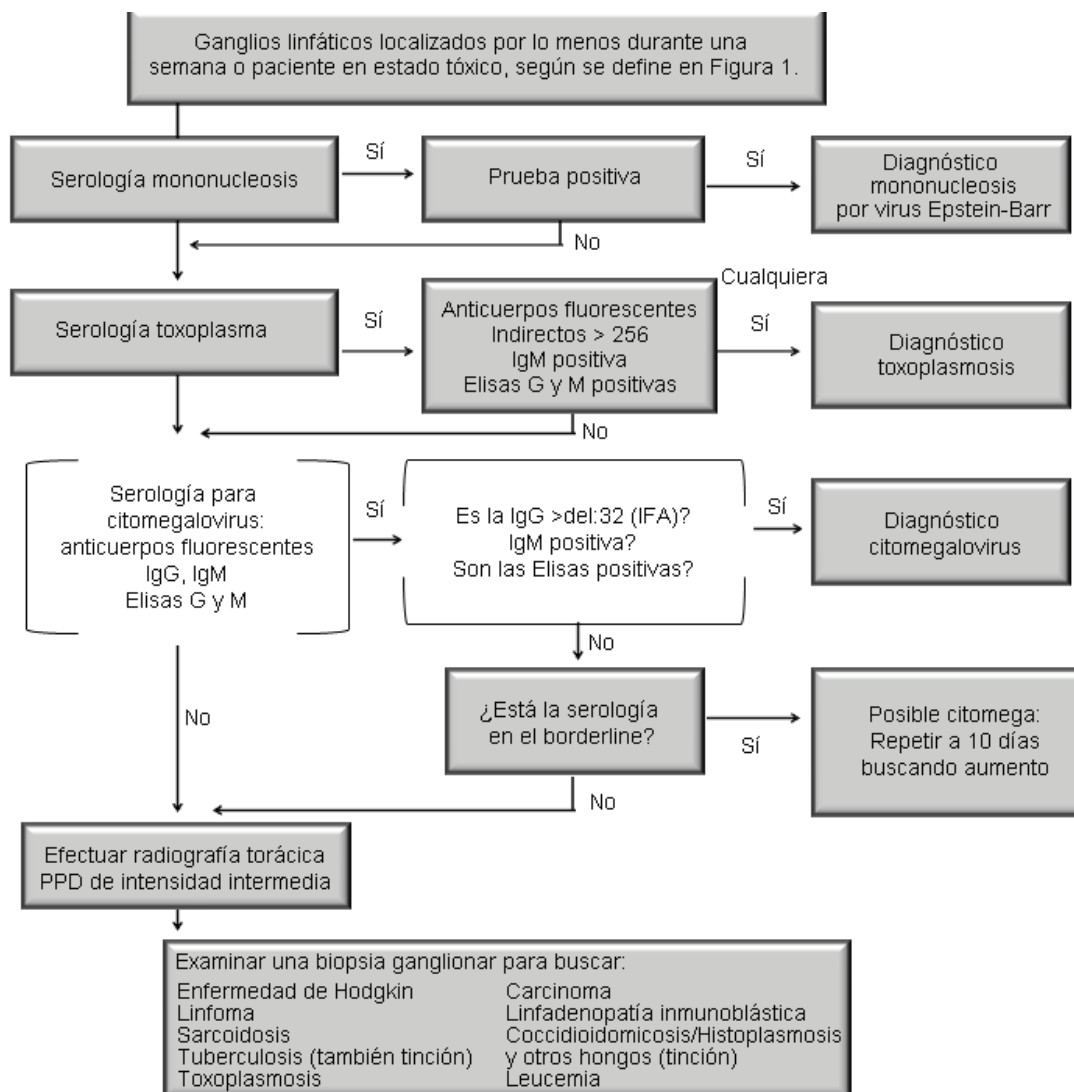


Figura N° 2. Investigación de ganglios linfáticos persistentes.

de un ganglio, pueden realizarse pruebas serológicas para anticuerpos del linfogranuloma. Al igual que con los ganglios axilares, se debe hacer biopsia si el ganglio persiste sin que se haya llegado a un diagnóstico definitivo.

Linfadenopatías persistentes

La Figura N° 2 indica un método a seguir para estudiar los pacientes que presentan adenopatías que han durado más de una semana o que presentan fiebre elevada, escalofríos o pérdida de peso. Una segunda prueba de serología de mononucleosis puede ser positiva a pesar de que la primera fuera negativa, debido a una respuesta retardada de anticuerpos. En estos casos, se pueden utilizar las pruebas Elisa anti-cápside y luego los EBNA del EBV. Al llegar a este punto, deben investigarse de forma más activa otras posibles causas de adenopatía. Los anticuerpos para la toxoplasmosis pueden buscarse de diversas maneras. Aunque generalmente un aumento o una disminución del título en cuatro veces es diagnóstica, las cifras superiores a determinados valores para cada prueba (según se detalla en la Figura N° 3) indican como muy probable una infección aguda por toxoplasma. En todo caso, un título IgM toxo o una Elisa alta definirá el diagnóstico con certeza.

La asociación de la infección por citomegalovirus y un síndrome espontáneo semejante a la mononucleosis es un hecho bastante infrecuente. Esta enfermedad puede caracterizarse por faringitis, esplenomegalia, fiebre, erupción cutánea y adenopatías localizadas o difusas, pero en algunos pacientes la linfadenopatía puede ser el signo predominante. Un título significativo o una Elisa alta (G y M) de anticuerpos define claramente la existencia de esta enfermedad y constituye la prueba diagnóstica más práctica, si no se dispone de instalaciones para efectuar el aislamiento del virus (en orina o saliva).

Al llegar a este punto, después de descartar por completo infecciones o lesiones locales y una mononucleosis por virus Epstein-Barr, citomegalovirus o toxoplasmosis, deben buscarse otras enfermedades sistémicas mediante una biopsia del ganglio.

El examen anatomopatológico de la biopsia debe incluir la búsqueda de linfoma de Hodgkin, leucemia, linfoma, sarcoidosis, tuberculosis, toxoplasmosis, carcinoma, coccidioimicosis, histoplasmosis y otras infecciones por hongos. En los últimos años se ha identificado el síndrome de linfadenopatía inmunoblástica como causa de una fiebre prolongada y de un aumento de tamaño de los ganglios linfáticos. Deben efectuarse sistemáticamente cultivos y tinciones para tuberculosis

y hongos. Las radiografías de tórax y la prueba cutánea de la tuberculina ayudan a interpretar las biopsias. Una hiperplasia o una inflamación inespecífica no excluye ninguna de estas enfermedades, y si persiste la sintomatología del paciente o si los ganglios no varían o aumentan de tamaño, puede ser necesaria otra biopsia a otros tejidos afectados.

Adenopatías generalizadas

Las adenopatías generalizadas suelen deberse a infecciones sistémicas, pero, como indica la Figura N° 3, hay que pensar también en una reacción a un fármaco.

Además de las enfermedades infecciosas investigadas en la Figura N° 2, los ganglios aumentados pueden deberse también a una endocarditis bacteriana, a una brucelosis o a otras infecciones menos frecuentes. Algunos datos de la historia clínica y de la exploración física pueden servir de orientación; la aparición de un soplo o los antecedentes de administración de medicamentos por vía endovenosa sugieren una endocarditis, entonces debe insistirse en la práctica de hemocultivos. Análogamente, unos antecedentes de contacto con ovejas, trabajo en un matadero o consumo de leche no pasteurizada sugieren la posibilidad de una brucelosis. Con frecuencia se piensa en la coccidiomycosis o la histoplasmosis, teniendo en cuenta la procedencia de un determinado ámbito geográfico y unos antecedentes concretos de exposición. La erupción cutánea, la artritis y la proteinuria son inespecíficas, pero deben hacer pensar en la posibilidad de un lupus eritematoso. Antecedentes de contacto con algún tuberculoso exigen que se investigue con toda atención la posible existencia de una tuberculosis.

La historia clínica y la exploración física para estas enfermedades con frecuencia son inespecíficos en los pacientes cuyo síntoma primario es la adenopatía; de ahí que deban efectuarse exámenes de laboratorio. El que se realicen conjunta o secuencialmente después de determinar los resultados de las pruebas anteriores, depende de las circunstancias y de la situación económica particular. Si no puede hacerse un diagnóstico seguro con la ayuda de alguna de las pruebas de laboratorio, deben practicarse biopsias para tratar de identificar las enfermedades mencionadas.

TEJIDO LINFOIDE ASOCIADO A LAS MUCOSAS

Alrededor de la mitad de los linfocitos del sistema inmune se localizan en el tejido linfoide asociado a las mucosas (TLAM), distribuido a lo largo de todas las membranas mucosas. De acuerdo con la mucosa

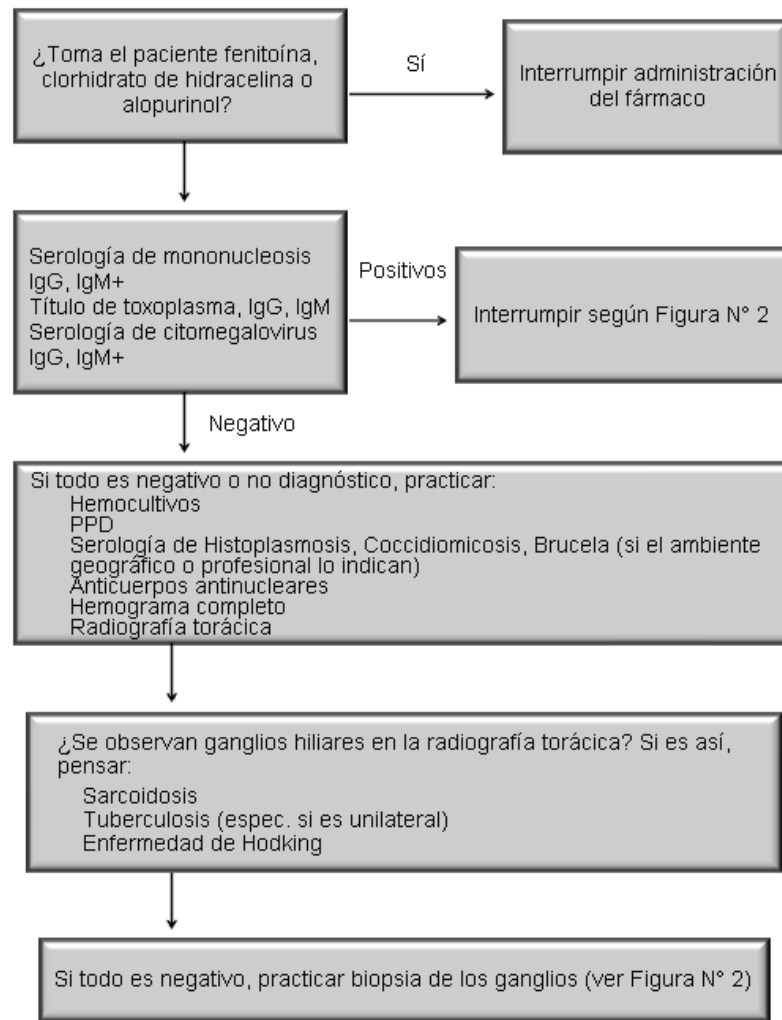


Figura N° 3. Adenopatías generalizadas.

específica donde se localizan, se identifican como tejido linfoide asociado al intestino (TLAI), tejido linfoide asociado a la nasofaringe, tejido linfoide asociado a los bronquios, entre otros. La función principal del TLAM es producir y secretar inmunoglobulina A en las membranas mucosas. Se puede dividir en sitios inductivos y sitios efectores. Los sitios inductivos contienen tejido linfoide secundario, en el que ocurre el cambio de clases de IgA y la expansión clonal de linfocitos B, como respuesta a la activación específica de linfocitos T. Las células T y B migran luego a los sitios efectores que están distribuidos en todas las mucosas a nivel de la lámina propia. En los sitios efectores, la IgA como dímeros unidos por una cadena J, se unen a un componente secretor que les permite viajar a través de la célula epitelial y ser secretada al lumen de las membranas mucosas. Los sitios del TLAM están separados anatómicamente, pero conectados funcionalmente por el sistema inmune común de las mucosas. Este sistema permite que la presentación de antígeno y la activación de linfocitos B en una mucosa

resulten en la secreción de IgA en las mucosas de diferentes órganos.

Los linfocitos intraepiteliales, de linaje T CD8+, se encuentran asociados a las células epiteliales de las mucosas en los sitios inductivos. Los compartimentos funcionales en estos tejidos son los folículos, la región interfolicular, la región del domo subepitelial y el epitelio asociado al folículo o linfoepitelio que contiene las células M. Estas células son células epiteliales especializadas, que transportan microorganismos y macromoléculas solubles del lumen intestinal a la región del domo subepitelial, permitiendo acceso a los antígenos del lumen al tejido linfoide.

Las placas de Peyer son parte de este sistema y aparecen como nódulos en la superficie serosa del intestino delgado. Fueron descritas en 1677 por Johannes Conrad Peyer, médico y anatomista suizo. En el ser humano hay aproximadamente 30 placas en los 200 cm distales del ileum, la mayoría en los 25 cm

distales. Están cubiertas en la superficie luminal del intestino por una capa de células M.

BIBLIOGRAFÍA

Burke J. Surgical pathology of the spleen: an approach to the differential diagnosis of splenic lymphomas and leukemias. Part I. Diseases of the white pulp. *Am J Surg Pathol* 1981; 5(6): 551-563.

Burke JS. Surgical pathology of the spleen: an approach to the differential diagnosis of splenic lymphomas and leukemias. Part II. Diseases of the red pulp. *Am J Surg Pathol* 1981; 5(7): 681-694.

Cesta MF. Normal structure, function, and histology of mucosa-associated lymphoid tissue. *Toxicol Pathol* 2006; 34(5): 599-608.

Cesta MF. Normal structure, function, and histology of the spleen. *Toxicol Pathol* 2006; 34(5): 455-465.

Chaplin DD. Lymphoid tissues and organs. En: Paul WE (editor). *Fundamental immunology*. 5 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2003. p. 419-453.

Eynard A, Valentich M, Rovasio R. *Histología y embriología del ser humano: bases celulares y moleculares*. 4 ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2008.

Greenfield S, Jordan MC. The clinical investigation of lymphadenopathy in primary care practice. *JAMA* 1978; 240(13): 1388-1393.

Larrañaga N, Espil G, Oyarzún A, De Salazar A, Kozima S. No nos olvidemos del bazo: el órgano huérfano. *Revista Argentina de Radiología* 2014; 78(4): 206-217.

Mebius RE, Kraal G. Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol* 2005; 5(8): 606-616.

Pearse G. Normal structure, function, and histology of the thymus. *Toxicol Pathol* 2006; 34(5): 504-514.

Rugeles MT, Patiño P, Montoya C. *Inmunología: una ciencia activa*. 2 ed. Colombia: Editorial Universidad de Antioquia; 2009.

Travlos GS. Normal structure, function, and histology of the bone marrow. *Toxicol Pathol* 2006; 34(5): 548-565.

Vargas P, Hurtado R, Villalobos JA. Esplenomegalia. *Rev Fac Med (Méx.)* 2013; 56(2): 37-45.

Willard-Mack CL. Normal structure, function, and histology of lymph nodes. *Toxicol Pathol* 2006; 34(5): 409-424.

Dr. Malcolm Acón Laws
Dra. Victoria Monterroso Azofeifa (†)

DEFINICIÓN DE LINFOMA HODGKIN (LH) O ENFERMEDAD DE HODGKIN (EH)

La enfermedad de Hodgkin (EH) o más correctamente el linfoma Hodgkin (LH), es una neoplasia linfoide maligna, localizada casi de manera exclusiva en tejido linfoide (ganglios linfáticos, bazo), con predominancia en ganglios axiales. Tiene características muy particulares que las distinguen de otras neoplasias malignas:

1. Las células tumorales en la mayoría de los casos son pocas (representan el 1-5% de la población dentro del tejido tumoral) y están dispersas entre una abundante población de células inflamatorias no tumorales. Esto se debe a diversas citoquinas que las células neoplásicas producen.
2. Dichas células tienen diferentes morfologías, presentes en distintas proporciones o ausentes del todo, según las variedades histológicas en las que se ha dividido la LH:

a. Células de Reed-Sternberg (R-S): células grandes (20-60 μ), binucleadas o multinucleadas, con núcleos grandes, vesiculosos (claros, con membrana nuclear reforzada) y nucleolos rojos grandes, que abarcan el 25% del área nuclear, rodeados de un halo claro. Esta célula debe estar presente en todos los casos para poder establecer el diagnóstico, excepto en la variedad de predominio linfocítico, donde suelen ser escasas (Figuras N° 1 y N° 2). Expresan CD30 y/o CD15 en la membrana celular y/o en la región perinuclear.

b. Células de Hodgkin: variedad mononuclear de la célula de Reed-Sternberg. Pueden o no estar presentes en cualquiera de los subtipos histológicos (Figuras N° 1 y N° 2). Expresan CD30 y/o CD15 en la membrana celular y/o la región perinuclear.

c. Células lacunares: células variantes de R-S con abundante citoplasma claro o eosinófilo, con núcleos regulares o polilobulados y

nucleolos inconspicuos o prominentes (figuras 1 y 4). Su característica es el abundante citoplasma, que frecuentemente se retrae por la fijación en formalina de los tejidos, dejando un espacio vacío o laguna a su alrededor, que le confiere el nombre. Presentes *sine qua non* en la variedad "esclerosis nodular". Expresan CD30 y/o CD15.

d. Células L&H: células grandes con núcleo polilobulado (semejante a una "palomita de maíz"), nucleolo inconspicuo, con cromatina vesicular y variable cantidad de citoplasma. Presentes en el LH nodular de predominio linfocítico. Su nombre deriva del término "linfocito e histiocito", debido a que esas son las poblaciones más prevalentes en esta variedad. Expresan el marcador pan-B CD20 y no expresan ni CD30 ni CD15 (Figuras N° 1 y N° 3).

3. El linfoma avanza en forma más o menos predecible, de un territorio linfático al adyacente, según el sentido de la circulación del sistema vascular linfático. Los grupos ganglionares más frecuentemente afectados son: cervicales, supraclaviculares y mediastinales.
4. Rara vez afecta tejidos u órganos no linfoides (menos del 1%). La localización en tejidos linfoides es debida a la expresión de ciertas quimocinas y sus receptores.

La definición del LH es histológica y requiere la presencia de las células de Reed-Sternberg o sus variantes, en un fondo inflamatorio apropiado. Por otro lado, aunque la célula de Reed-Sternberg es *sine qua non* para el diagnóstico de EH, no es patognomónica. Células binucleadas con la misma morfología pueden estar presentes en infecciones como la mononucleosis infecciosa, causada por el virus de Epstein-Barr y el citomegalovirus, o bien, en linfomas no Hodgkin y otros tumores, como carcinomas, melanoma y sarcomas.

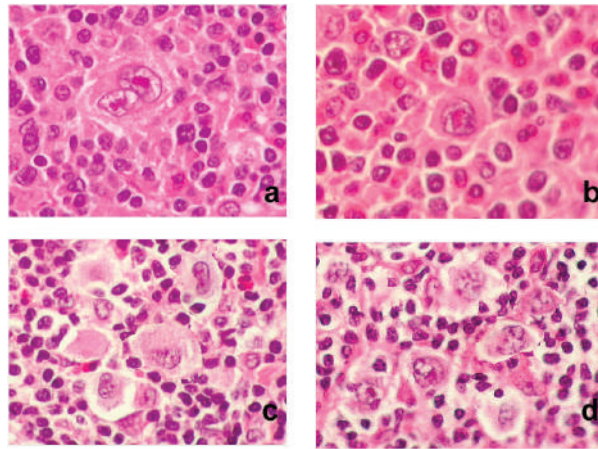


Figura N° 1. Célula de Reed-Sternberg (a), célula de Hodgkin (b), células lacunares (c) y células L&H (d).

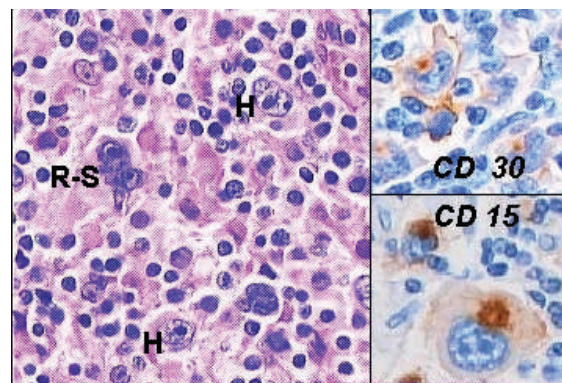


Figura N° 2. Célula de Reed-Sternberg (multinucleada) y células de Hodgkin (mononucleadas). Se observa abundante citoplasma, núcleos claros, con membrana nuclear reforzada y halo claro alrededor de un nucléolo prominente. Inmunohistoquímica con anticuerpos monoclonales contra CD30 y CD15: hay expresión (color pardo intenso) en la membrana celular y/o el aparato de Golgi; los linfocitos pequeños circundantes están contrateñidos con hematoxilina (azul); el CD15 también marca granulocitos (arriba, a la izquierda del recuadro).

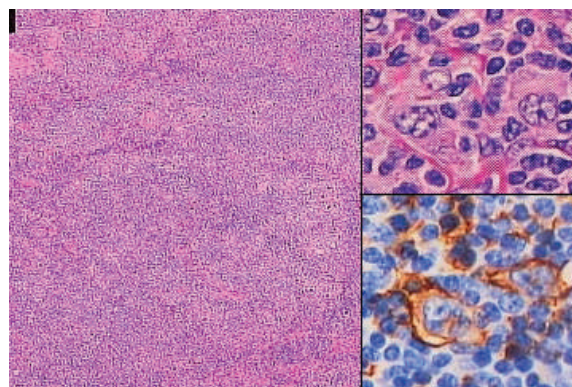


Figura N° 3. Nodular de predominio linfocítico: estructura vagamente nodular del ganglio, con células L&H en un fondo de linfocitos. Arriba a la derecha, un acercamiento de células L&H, con núcleos “en palomitas de maíz”, que expresan de manera fuerte el marcador para linfocitos B CD20 (color pardo intenso) (abajo, derecha).

CLASIFICACIÓN DEL LINFOMA HODGKIN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó la más reciente clasificación del LH en el 2008, dentro de la clasificación de enfermedades linfohematopoyéticas, donde agregó una categoría nueva: la variedad de LH clásica rica en linfocitos. Además, separó la variedad nodular de predominio linfocítico de las formas clásicas, basado en la ausencia de la expresión de dos marcadores inmunohistoquímicos, el CD30 y el CD15.

Los casos de LH son heterogéneos, tanto histológica como inmunohistoquímicamente y casi todos los casos pueden clasificarse, según la OMS, en cinco variedades o subtipos distintos, con algunas variantes y con características clinicopatológicas particulares. Estas variedades son:

1. Nodular de predominio linfocítico (NPL).
2. LH Clásico:
 - a. Esclerosis nodular (EN).
 - b. Celularidad mixta (CM).
 - c. Linfoma de Hodgkin clásico rico en linfocitos (LHCRL).
 - d. Depleción linfocítica (DL).
3. No clasificable.

El grupo “no clasificable” no es propiamente una categoría; en él se colocan los casos en los que el compromiso del ganglio es muy temprano, sin una definición clara hacia alguno de los subtipos arriba descritos. La mayoría corresponden a etapas tempranas de CM o EN, lo cual se puede demostrar en otros ganglios o en biopsias tomadas tiempo después. En este grupo también se ubican los casos con material muy escaso para una valoración adecuada, pero que claramente corresponden a LH por histología e inmunofenotipo.

INCIDENCIA DEL LH Y FRECUENCIA DE SUS SUBTIPOS

Según datos recientes, a nivel mundial los linfomas Hodgkin constituyen el 15% de todos los linfomas y tienen dos picos de máxima incidencia: entre los 15 y 34 años de edad y después de los 50 años. Es menos frecuente en los países en vías de desarrollo.

Datos del *National Cancer Institute* en Estados Unidos de América, muestran que en los años 2006-2010 la incidencia de LH en la población masculina caucásica fue de 3,4 por 100.000 habitantes, mientras que en la población masculina afroamericana fue de 3,2 por

100.000 habitantes. En las mujeres la incidencia es menor. En cuanto a la proporción de los subtipos de LH, esta es de 6% para el NPL, 58% para EN, 23% para CM, 4% para DL y 9% para casos no clasificables.

En Costa Rica, en el quinquenio de 1988-1992, según el Registro Nacional de Tumores, la incidencia de LH fue de 1,6 por 100.000 habitantes, mientras que la proporción de los subtipos fue de 8% para NPL, 50% para EN, 35% para CM y 2,5% para DL. De acuerdo con un estudio realizado en un hospital general de este país, se determinó que el LH representó un 21,5% de todos los linfomas diagnosticados en dos años (2011-2013).

En 1971 el Dr. Pelayo Correa, patólogo colombiano, y el Dr. Gregory O'Connor, hematólogo, publicaron los resultados de un estudio de casos de LH en Cali, Colombia, comparados con los de países industrializados, en el que determinaron la existencia de tres patrones epidemiológicos en la incidencia del LH. El patrón I estaba caracterizado por alta incidencia en niños y prevalencia de subtipos asociados a peor pronóstico (CM y DL); el patrón III, con alta incidencia en adultos jóvenes y predominio de subtipos asociados a mejor pronóstico (EN y PL), y el patrón II, intermedio entre estos. El patrón I se da en países en vías de desarrollo, el III en países industrializados (EEUU y Europa) y el II en áreas rurales de países industrializados y en algunos países de Europa Central.

En Costa Rica, en el quinquenio 1988-1992 se encontró una curva bimodal para el LH, con un pico en la segunda década y con bajo porcentaje de casos en niños menores de 5 años (5%), colocando a este país en el patrón II descrito por Correa y O'Connor.

EL LINFOMA HODGKIN COMO VERDADERA NEOPLASIA

La naturaleza inflamatoria versus la neoplásica del linfoma Hodgkin permaneció sin resolverse por siglo y medio, hasta que se logró demostrar que las células de Reed-Sternberg y sus variantes reunían los tres criterios que deben caracterizar a una célula tumoral: inmortalidad, aneuploidía y monoclonalidad.

La mayoría de las células de R-S expresan antígenos de proliferación (Ki-67 y PCNA); es decir, se encuentran en la fase activa del ciclo celular. La razón por la que estas células neoplásicas no proliferan en forma efectiva y representan solo un porcentaje muy bajo (1-5%) de la población de los sitios afectados, radica en alteraciones como arresto mitótico en metafase/telofase y fragmentación de las cadenas de ADN, lo cual produce mitosis inefectivas o abortivas. Así,

solo una minoría de células logra reproducirse y los daños de su ADN conducen a apoptosis, parcialmente contrarrestada por sobreexpresión de Bcl-2 y p53.

Aún antes de que se documentaran los parámetros indicados para establecer el carácter neoplásico de esta entidad, el LH se consideró una neoplasia maligna por su evolución clínica progresiva, con muerte del 90% de los pacientes dentro de los 3-4 años del diagnóstico, y su respuesta clínica favorable al tratamiento antitumoral con radio y/o quimioterapia. Este abordaje terapéutico logra controlar la enfermedad en un 75% de los casos.

ORIGEN DE LAS CÉLULAS DE REED-STERNBURG Y SUS VARIANTES

El origen de las células de Reed-Sternberg y sus variantes constituyó un enigma por mucho tiempo, por dos motivos:

1. Las células son escasas.
2. El linfoma Hodgkin es un grupo heterogéneo.

Los análisis inmunohistoquímicos y, sobre todo, la microdissección de las células tumorales para cultivos y estudios moleculares, han permitido confirmar la naturaleza neoplásica, purificar los subtipos histológicos y determinar el origen de la célula de R-S y sus variantes.

En el pasado se postularon muchos orígenes para la célula de R-S, entre ellos: linfoblasto, linfocito activado B o T, precursor linfoide inmaduro, célula mielomonocítica, megacariocito, histiocito, célula folicular dendrítica, célula interdigital dendrítica, célula pluripotencial (19) y un hibridoma entre histiocito y linfocito T o B. Sin embargo, los dos orígenes con mayor apoyo por diversos investigadores fue el de histiocitos y el de linfocitos B o T.

Mediante análisis biomoleculares de inmunoglobulinas, así como por análisis inmunohistoquímicos, se ha demostrado el por qué las células de R-S derivan de linfocitos B centrofoliculares, que han sido estimulados por antígeno.

Cabe destacar que la subpoblación de linfocitos B centrofoliculares que da origen al tipo predominio linfocítico, tiene algunas diferencias con la que origina las formas clásicas o el LH clásico rico en linfocitos.

En el subtipo o variedad de linfoma Hodgkin nodular de predominio linfocítico (LHNPL), es fácilmente demostrable que la célula tumoral L&H es de inmunofenotipo B (CD19+/CD20+/CD22+/CD79 a+,

PAX5+). Además, expresa LCA (CD45) y EMA y no expresa los marcadores encontrados en las otras variantes de LH (CD30, CD15). En contraste con otros linfomas no Hodgkin de origen en linfocitos B, no expresa inmunoglobulina detectable por métodos de rutina. Asimismo, las células L&H expresan las proteínas Bcl-2 y Bcl-6, lo que no ocurre en las células tumorales de las otras formas de LH. La Bcl-2 es una proteína mitocondrial, cuya sobreexpresión permite al linfocito B evadir la apoptosis o muerte celular programada. El LHNPL sobreexpresa Bcl-2, pero contrario a lo que sucede en el linfoma no Hodgkin folicular (LNHF), esta sobreexpresión no es consecuencia de la traslocación t(14;18) (24,25). El Bcl-6, por su parte, es un regulador transcripcional que se expresa normalmente solo en linfocitos B dentro del centro germinal y regula la diferenciación y el desarrollo de las células centrogerminales. Adicionalmente, las células L&H expresan CD10, CD40 y CD86 (B7), que son moléculas de activación involucradas en la interacción de los linfocitos B con los linfocitos T.

Los análisis moleculares de los genes de la región variable de la inmunoglobulina (Ig) han mostrado la presencia de rearreglo clonal del gen de la Ig en la mayoría de los casos de LHNPL. Además, se ha documentado que este rearreglo es productivo por la demostración de la producción de Ig monotípica por hibridación *in situ*. Fisiológicamente, las mutaciones somáticas de la región variable de la Ig ocurren en la etapa de centroblasto de las células centrofoliculares y pueden conferir mayor o menor afinidad hacia el antígeno. Los centroblastos con menor afinidad y aquellos con muchas mutaciones (hipermutaciones) de la región variable, que también pierden afinidad antigénica, normalmente sufren apoptosis. En las células L&H se ha demostrado que la región variable está hipermutada y puede sufrir aún más mutaciones ("ongoing mutations"), lo que sugiere que estas células son centrofoliculares en la etapa de centroblastos, que han escapado del mecanismo de apoptosis. La resistencia a la apoptosis de las células L&H no está relacionada con un rearreglo del oncogen Bcl-2 por la traslocación t(14;18), a diferencia del mecanismo neoplásico de los linfomas foliculares.

En los otros subtipos de LH clásico, las diversas variedades de células tumorales expresan dos marcadores creados contra células de R-S en cultivo, que en un inicio se creyeron exclusivos de estas: el CD30 y el CD15. El CD30 es una glicoproteína de 120 kD, expresada normalmente en linfocitos activados y que se codifica en el gen 1p36. Su ligando (CD30L) tiene homología con el factor de necrosis tumoral (TNF). Este marcador es una proteína de membrana con tres dominios. El dominio extracelular se secreta por acción

de la metaloproteinasa. Sus niveles en sangre pueden ser medidos y se correlacionan con el tamaño y la diseminación del linfoma. El CD15, también llamado hapteno X, es una secuencia de azúcares presente en la ceramida y en varios glicolípidos y glicoproteínas, cuya función no ha sido plenamente establecida.

Las células tumorales del LH clásico, a diferencia de las células L&H, expresan vimentina, fascina, restina y TARC ("*thymic and activation-related chemokine*"), una quimocina que convoca linfocitos Th2 (estas tres últimas son proteínas que caracterizan a las células dendríticas). Además, expresan CD25, HLA-DR, ICAM-1, CD95, CD40 y CD86, todas moléculas de activación de linfocitos B. En un 20-35% coexpresan antígenos de linfocitos B (CD20, CD79a) o, con menor frecuencia, de linfocitos T (CD3). A diferencia de las células L&H, no expresan Bcl-6. La ausencia de expresión de marcadores B en la mayoría de los casos, junto con expresión aberrante de otros marcadores (GATA3, T-bet, CD2, CD3, CD4) puede explicarse por la falta de actividad de un homodímero específico de células B (causada por disminución de la expresión de factor de transcripción E2A), así como por la sobreexpresión de antagonistas del E2A, como ABF-1 (factor 1 de activación de células B) y Id2 (inhibidor de diferenciación 2).

Al igual que en las células L&H, las células de R-S presentan rearrreglo de las regiones variables de la Ig, lo cual las coloca en la subpoblación de centroblastos. No obstante, a diferencia de las células L&H, no presentan producción ni de ARNm ni de Ig. Esto condujo a la conclusión de que son centroblastos que han perdido su capacidad de expresar un receptor de antígeno funcional. Inicialmente, se atribuyó a mutaciones que invalidan la producción de la Ig, tales como la introducción de secuencias de parada, deleciones, inserciones o alteraciones de la estructura terciaria que no permiten la unión con el antígeno. En la actualidad, se cree que el trastorno principal es en el mecanismo de transcripción, por la disminución de factores de transcripción Oct2, BOB.1 y PU.1, lo cual impide la expresión de inmunoglobulina. Normalmente, esto provocaría apoptosis. El mecanismo de escape a la apoptosis de las células de R-S y sus variantes puede explicarse por alteraciones en varias vías de señales intracelulares que se han documentado en estas, como la de CD30, NF- κ B, AP-1 y Notch.1. Dichas alteraciones conducen a expresión y activación de moléculas anti-apoptóticas, como TRAF1, XIAP, cIAP2, c-FLIP, y de moléculas pro-proliferación, como ciclina D2.

CARACTERÍSTICAS CLINICOPATOLÓGICAS DE LOS SUBTIPOS DE LH

Nodular de predominio linfocítico (NPL)

Representa alrededor de un 4-5% de los casos. Como su nombre lo indica, su población predominante es de linfocitos, con células L&H dispersas o conglomeradas, localizadas principalmente en nódulos (Figura N° 3). Rara vez se encuentran las demás poblaciones celulares vistas en los otros subtipos de LH, como eosinófilos, células plasmáticas o neutrófilos. También son raras las células de R-S, a tal punto que algunos autores consideran que no son necesarias para el diagnóstico.

Las células L&H son grandes, de citoplasma claro, con alto índice núcleo/citoplasma, núcleo polilobulado (semejante a "palomitas de maíz"), con cromatina muy fina y nucleolos generalmente inconspicuos. Sin embargo, puede haber variabilidad en la morfología de las células L&H, con mayor atipia y nucleolos más prominentes conforme avanza la enfermedad. En los ganglios afectados, la arquitectura está sustituida por nódulos, compuestos por folículos linfoides con centros germinales alterados, acompañados de folículos linfoides hiperplásicos. Los centros germinales alterados son semejantes a los observados en el proceso benigno llamado "transformación progresiva de centros germinales", en el que hay un marcado aumento del tamaño de algunos de los centros foliculares (3-4 veces el tamaño de un folículo normal), con linfocitos pequeños B de la zona del manto invaginándose hacia el centro, con la consecuente dispersión de las células centrogerminales. La transformación progresiva de centros germinales puede darse aisladamente o, con menor frecuencia, preceder o acompañar al LHNPL, por lo que es una llamada de atención al médico para que siga un control clínico del paciente que lo presente.

Aunque los linfocitos pequeños en el LHNPL son predominantemente B, es común observar un anillo de linfocitos pequeños T, CD4+/CD57+/Bcl6+, alrededor de las células L&H; además, se encuentran conglomerados de células foliculares dendríticas, CD21+, dentro de los nódulos neoplásicos.

La OMS requiere que parte del tumor tenga patrón nodular, y de hecho, la mayoría de los casos son de patrón nodular, pero pueden haber zonas con patrón difuso, con los linfocitos pequeños y las células L&H dispersas. En las zonas difusas predominan los linfocitos T en el fondo y se pierde la trama de células interfoliculares dendríticas. Otros patrones descritos son: el serpiginoso o con áreas nodulares

interconectadas, nodular con presencia de células L&H extranodular predominante, el nodular con un fondo rico en linfocitos T y el difuso “comido de polilla” con fondo rico en linfocitos B; estos patrones pueden ser mixtos. La presencia de patrón difuso es un factor predictivo de recurrencia. De igual forma, en las recurrencias tiende a haber una mayor propensión a presentar patrón difuso. Un 15% de los casos pueden

presentar pequeños centros germinales dentro del patrón nodular y un 20% de los casos puede presentar esclerosis prominente, sobre todo en casos de recurrencia. En ciertas situaciones puede encontrarse la presencia de agregados de histiocitos epitelioides.

La diferencia de esta variedad con respecto a las de LH clásico se resume en el Cuadro N° 1.

Cuadro N° 1. Características inmunohistoquímicas de linfoma Hodgkin nodular de predominio linfocítico (LHNPL) vs LH clásico vs Linfoma de células B grandes rico en células T (LCBGRCT)			
Anticuerpo	LHNPL	LH clásico	LCBGRCT
CD45 (LCA)	+	-	
CD20	+	-/+	+
PAX-5	+	+	+
CD30	-/+	+	-
CD15	-	+	-
EMA	+	-	
EBV	-	+/-	-
Cadena J	+	-	
CD40	+	+	
CD86	+	+	
Oct-2	+	-	
BOB.1	+	-	
Pu.1	+	-	
Bcl-6	+	-/+	
Linfos T CD57+/Bcl-6+	+	-	-
N° células TIA-1 +	Bajo	Alto	Alto

Además de lo indicado en el Cuadro N° 1, hay diferencias clínicas. Por lo general, el LHNPL se presenta en estadios tempranos, predomina en hombres, el compromiso mediastinal es poco frecuente (7% vs 80% de EN y 15% de LHCRL), tiene un curso indolente y, frecuentemente, presenta varias recaídas tardías, sin que esto empeore el pronóstico. Además, no se disemina en forma ordenada, con progresión según la circulación linfática, como el LH clásico.

Hasta un 10% de los casos de LHNPL puede presentar progresión a un linfoma no Hodgkin de células B grandes, que tiende a tener mejor pronóstico que un linfoma de células B grandes *de novo*.

LH clásico rico en linfocitos (LHCRL)

En esta categoría se encuentran los casos con linfoma Hodgkin de inmunofenotipo clásico (CD30+ y/o CD15+), con células de R-S o lacunares clásicas, pero

en un fondo de linfocitos, sin eosinófilos o con muy pocos de estos y sin células plasmáticas (Figura N° 4). El patrón del ganglio es difuso, aunque pueden haber casos parcialmente nodulares, que algunos autores llaman linfoma Hodgkin folicular.

Estos casos no se colocan en la variedad de NPL, porque usualmente no hay células L&H, pero sí tiene ocasionales células de R-S o de Hodgkin, con el inmunofenotipo apropiado (CD30 y/o CD15+). Aparte de la población tumoral que predomina, tienen otras semejanzas con la variedad NPL: un 3-5% de los casos coexpresan marcadores B, puede tener áreas nodulares ricas en linfocitos B, con una red de células dendríticas foliculares CD21+ y las células de R-S pueden estar rodeadas de linfocitos T CD3+. Sin embargo, algunos investigadores encuentran importantes diferencias, aparte del inmunofenotipo de las células de Reed-Sternberg:

- a) Aunque en ambas hay una red de células dendríticas foliculares CD21+, estas se encuentran dispersas por todo el nódulo neoplásico en el NPL; mientras que en el LHCRL tienden a estar condensadas excéntricamente, formando un centro germinal atrófico. Se considera que el LHNPL afecta el folículo linfoide, y el LHCRL está situado en la zona del manto expandida.
- b) A pesar de que en ambos pueden haber linfocitos CD57+, solo el NPL muestra rosetas de linfocitos CD57+/Bcl-6+ alrededor de células de morfología L&H CD20+/Bcl-6+.

Por otra parte, el LHCRL representa un 6% de los casos y suele tener características clínicas intermedias entre NPL y LH clásico:

- a) Semejante a NPL, tiende a presentarse en pacientes masculinos, en estadios tempranos, sin tumoraciones mayores de 8-10 cm y sin síntomas generales, con compromiso mediastinal

infrecuente (15%, en contraste con 80% en LHCEN).

- b) Semejante a CM, se presenta a edades mayores que el NPL o la EN.
- c) Semejante a LH clásico, tiene menor tendencia a recurrir que el NPL y cuando recurre, tiene peor pronóstico que este. Su supervivencia general es similar a los otros subtipos o variedades de LH.

Esclerosis nodular (EN)

Representa el 60-80% de los casos de LH en países industrializados. Hay dos características que diferencian a la EN de los otros subtipos: las células lacunares y las bandas de colágena birrefringente que separan en nódulos a la población neoplásica (Figura N° 5). Dentro de los nódulos, la morfología puede ser de predominio de linfocitos, de celularidad mixta con eosinófilos, células plasmáticas y acúmulos de polimorfonucleares neutrófilos o de depleción linfocítica, con muchas células de R-S y pocos linfocitos.

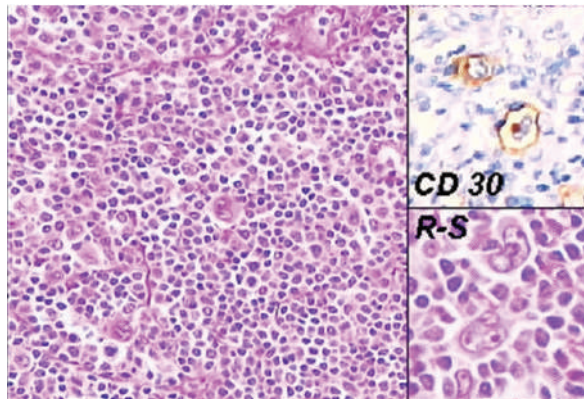


Figura N° 4. Linfoma Hodgkin clásico, rico en linfocitos. Sobre un fondo difuso de linfocitos pequeños, hay ocasionales células con morfología de células de R-S y de Hodgkin (recuadro inferior), que marcan con los anticuerpos clásicos del LH (CD30: recuadro superior; CD15 no mostrado).

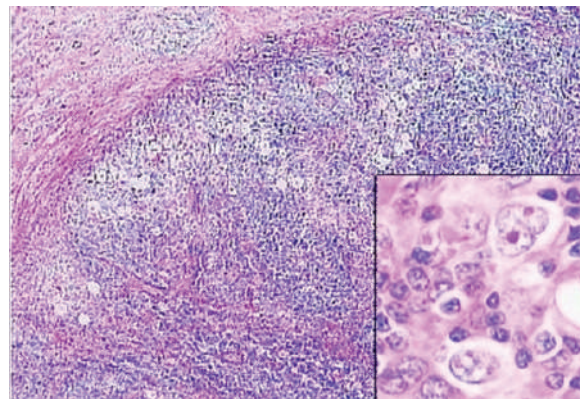


Figura N° 5. Variedad de esclerosis nodular: banda gruesa de colágena (arriba, a la izquierda), separando en grandes nódulos el parénquima ganglionar. Dentro del nódulo, linfocitos y células lacunares aisladas o en pequeños conglomerados. Recuadro: células lacunares con y sin nucléolo prominente.

Existen tres subvariedades de EN:

- a) *Fase celular*: hay células lacunares en el fondo de LH apropiado, pero no hay formación de nódulos por bandas de colágena. Sin embargo, debe haber por lo menos una banda de colágena birrefringente, bajando desde la cápsula hacia el parénquima. Muchos de estos casos ahora son clasificados dentro de la categoría de LHC rico en linfocitos.
- b) *Sincicial*: presenta grandes sincitios de células lacunares, frecuentemente asociadas a necrosis. Es importante conocerla y efectuar estudios inmunohistoquímicos para no confundirla con un linfoma no Hodgkin de células grandes no hendidas B con esclerosis, sobre todo en casos mediastinales.
- c) *Fibroblástica*: con una proliferación de fibroblastos, sin las bandas de colágeno usuales de la esclerosis nodular.

Grados de esclerosis nodular

Cuando la EN tiene más del 25% con numerosas células tumorales de citología muy pleomórfica o más del 80% de depleción linfocítica de la variedad fibrohistiocítica, se considera como grado 2, que constituye el 15-25% de los casos. Cuando no se presentan estas características, se clasifican como grado 1, el cual representa un 75-85% de los casos. El grado 2 se correlaciona con masa grande (> 8-10 cm), estadio avanzado y poca respuesta a radioterapia.

La división puede ser difícil y su significado ha sido controversial.

Cuando un centro médico tiene un alto índice de recaída o sobrevida baja, los pacientes con grado 2 tienen peor pronóstico. Pero, si el centro tiene bajo índice de recaída y sobrevida alta, el grado no tiene impacto pronóstico.

El impacto pronóstico es más evidente en pacientes con recaídas: los de grado 2 tienen una sobrevida mucho más corta que los de grado 1. Esto parece indicar que los pacientes de grado 2 deben tratarse de manera más agresiva y los del grado 1 con esquemas menos agresivos, ya que probablemente se tendrá mejor curso clínico. Por el momento, la clasificación de la OMS recomienda hacer la distinción, aunque no de manera obligatoria, a pesar de que no se tome en cuenta para un tratamiento distinto, con el fin de hacer estudios comparativos en el futuro.

Celularidad mixta

Representa un 15-30% de casos de LH en las series mayores. Por lo general, hay patrón difuso o solo vagamente nodular. Las células de Reed-Sternberg y sus variantes mono o polinucleadas son frecuentes y están acompañadas de una población inflamatoria mixta, con o sin fibrosis reticular (Figura N° 6). Puede tener variantes: interfolicular o con abundantes histiocitos epitelioides. Es frecuente en pacientes con SIDA; es más común en adultos mayores y suele presentarse en estadios más avanzados.

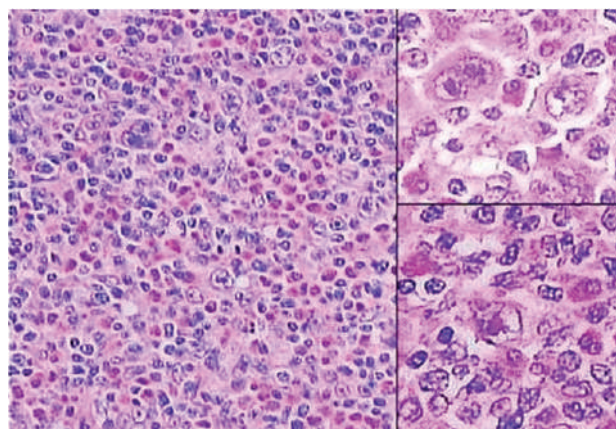


Figura N° 6. Celularidad mixta: en un fondo de linfocitos y abundantes eosinófilos, hay células de R-S y de Hodgkin. Recuadro superior: célula de R-S. Recuadro inferior: célula de Hodgkin.

Depleción linfocítica

Representa menos del 1% de casos de LH en series recientes. Posee gran cantidad de células de R-S,

con extensa necrosis o fibrosis y con muy pocas células inflamatorias asociadas (Figura N° 7). Tiene dos variedades: fibrótica (paucicelular, con fibrosis prominente, que atrapa células tumorales, las cuales

están presentes en número variable), y reticular o sarcomatoide, en la que hay gran cantidad de células tumorales.

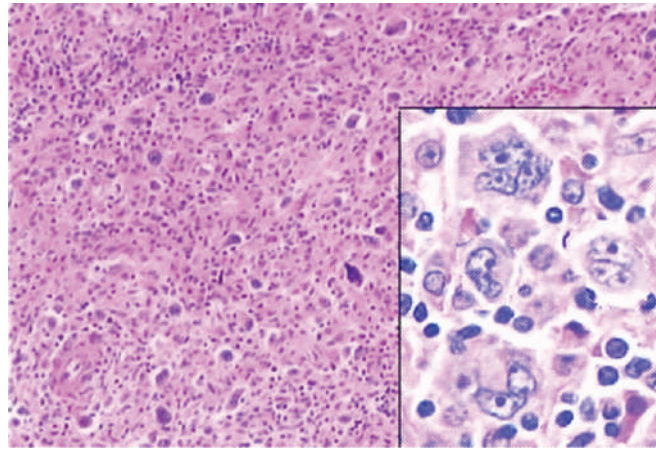


Figura N° 7. Depleción linfocítica: abundantes células de R-S, con pocos linfocitos, en un fondo de esclerosis fina. Recuadro: células de R-S polinucleadas.

Con la depuración de esta categoría, al extraer los casos de linfoma de células T grandes anaplásicas CD30+ o los linfomas T periféricos, representa menos del 1% de los casos de LH. Se presenta en personas mayores o en pacientes con SIDA, en estadios avanzados. Es raro en ganglios periféricos. Usualmente, ocurre en abdomen (bazo, hígado) y médula ósea.

Inmunofenotipo de LHC

La mayoría de los casos reportados son CD30+/CD15+/CD20-/CD3-/CD45-/BOB.1-/OCT-2/PU.1- (ver Cuadro N° 1). Sin embargo, un 20-35% de los casos pueden expresar CD20 y/o CD79a. El CD30 está positivo en un 98% de los casos, en varios patrones: patrón de membrana y/o Golgi (este último por acúmulo del precursor de 90kD). El patrón Golgi es casi exclusivo en células linfoides, con excepción del carcinoma embrionario. El patrón difuso es menos específico de LH: puede verse en carcinoma pancreático, carcinoma indiferenciado de rinofaringe o melanoma maligno. La intensidad y el número de células positivas pueden variar de un caso a otro, incluso dentro de un mismo caso. El CD15 es un anticuerpo más difícil de manejar; requiere de un buen método de rescate antigénico, anticuerpo secundario IgM, en vez del usual IgG, y un solvente especial, para mejorar su sensibilidad en nuestros laboratorios. Reconoce una secuencia de azúcar, denominada hapteno X o Lewis X. En Costa Rica el CD15 da positivo en menor número de casos que el CD30. En la literatura se reporta su expresión en 80% de los casos. Presenta los mismos patrones de positividad que el CD30: membrana y/o Golgi, o difuso. La expresión de CD15 tampoco es patognomónica, ya que puede demostrarse en todas las etapas de

los granulocitos, en monocitos de sangre periférica, en algunos histiocitos y, ocasionalmente, en otros linfomas T y B, y en otros tipos de tumores.

El Grupo Alemán de Estudio de Hodgkin encontró que un 83% de sus casos eran CD30+/CD15+ y propuso que la ausencia de expresión del CD15 correlaciona con menor supervivencia libre de enfermedad y peor supervivencia general.

DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DEL LHNPL

Su diagnóstico diferencial es con LHCRL o con linfomas no Hodgkin (LNH):

1. Linfoma difuso de células B grandes rico en células T/histiocitos (LBRCT/H): es una variedad del linfoma no Hodgkin difuso de células grandes, con la particularidad de que las células tumorales también están dispersas entre una población predominante de linfocitos pequeños (representan menos del 10% de la población). Las células grandes tumorales pueden tener morfología de células L&H, de inmunoblastos, de centroblastos o de las tres. Es frecuente la presencia de pequeños conglomerados de histiocitos epitelioides. Algunos casos pueden ser muy difíciles de diferenciar, sobre todo considerando que el LHNPL puede asociarse a un LNH de células grandes en 5-10% de los casos.

A diferencia del LHNPL, el LBRCT/H no tiene la disposición nodular encontrada con frecuencia en el LHNPL; siempre tiene patrón difuso. Además, los linfocitos grandes tumorales del LBRCT/H

expresan fuertemente el CD20, en comparación con la expresión más débil en LHNPL. También, a diferencia del LHNPL, predominan los linfocitos pequeños T (no los B), no hay linfocitos CD57+ y no se encuentra la red o conglomerados de células foliculares dendríticas CD21+. A la vez, tiene alta densidad de células citotóxicas TIA-1 (ver Cuadro N° 1). Asimismo, se presenta predominantemente en hombres de edad adulta (40-50 años), en estadios avanzados (III y IV) con hepatoesplenomegalia y compromiso de médula ósea. Su comportamiento es agresivo, con poca respuesta a terapia. Existe un pequeño porcentaje de casos con una morfología llamada de la zona gris (*"gray-zone"*); en estos hay un espectro de características de ambas entidades, lo cual hace casi imposible distinguir entre ambas. Algunos autores creen que se trata de un tipo de linfoma con un espectro de presentaciones que van desde LHNPL hasta el LBRCT/H. Sin embargo, todavía no se logra aclarar esta teoría.

2. Linfoma de linfocitos pequeños B. En este no hay células L&H; lo que tiene es presencia de pseudonódulos o pseudofolículos hasta en un 75% de los casos, los cuales son conglomerados de prolinfocitos y parainmunoblastos.
3. Transformación progresiva de centros germinales (TPCG) (ya analizado en el apartado de LHNPL). Los nódulos de la TPCG son redondos, están bien circunscritos y se encuentran separados entre sí, frecuentemente incluso con folículos reactivos intercalados. Los nódulos del LHNPL están adosados unos a otros, "espalda con espalda", con amoldamiento, poco circunscritos, con un límite

poco preciso hacia áreas de patrón difuso. Los nódulos de la TPCG tienen linfocitos pequeños, centrocitos y centroblastos, y no contienen los núcleos lobulados de las células L&H. Por inmunohistoquímica, ambas entidades consisten de nódulos grandes de células B CD20+, con una red de células foliculares dendríticas CD21+ y numerosas células T CD57+. Los nódulos del LHNPL contienen más células T conglomeradas. Asimismo, las células grandes B están rodeadas por rosetas de linfocitos T.

DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DEL LH CLÁSICO

El diagnóstico diferencial de las formas clásicas de LH es con dos tipos de LNH. Esta distinción es importante, porque requieren ser tratados con esquemas terapéuticos diferentes.

1. Linfoma difuso de células B grandes primario del mediastino: se asemeja clínicamente al LH clásico EN (LHCEN), en su presentación mediastinal, en especial en personas jóvenes. Histológicamente, pueden semejarse, pues ambos presentan fibrosis y células claras, sobre todo en la variedad sincitial de EN. Se diferencian en que el LNH de células B grandes primario mediastinal no suele presentar el fondo inflamatorio tan polimórfico como lo muestra el LH, ni las células de H/R-S tan clásicas y su evolución es clínicamente agresiva.

En los últimos años, se han estudiado las características inmunohistoquímicas, citogenéticas y moleculares entre estos linfomas y se han encontrado similitudes y diferencias significativas (son otros linfomas de la zona gris) (Cuadro N° 2).

Cuadro N° 2. Diferencias y similitudes entre características del LHCEN y el LNH difuso de células grandes B del mediastino		
	LHCEN	LDCBG primario del mediastino
Célula tumoral	Cél. lacunar, H, R-S	Células claras
Infiltrado polimórfico por IL-5, 6, 10	Sí	No
Ig	-	-
CD20/CD79a	-/+ (25-35%)	+
OCT-2, BOB.1, PU.1	-	+
CD30	+	-/+ débil, heterogénea
CD15	+	-
EBV	+/-	-
Bcl-6	-/+	+

Cuadro N° 2. Diferencias y similitudes entre características del LHCEN y el LNH difuso de células grandes B del mediastino

CD23 (56)	NR	+ (70%)
MAL* (57)	-/+ (7%)	+ (70%)
Ganancia del cr 9p	25%	75%
Ganancia del cr 2p	50%	20%
Activación de vía de NF-kB*	Sí	Sí
Activación de STAT6*	Sí	Sí
Mutaciones SOCS*	Sí	Sí

* Proteínas de membrana involucradas en transducción de señales de linfocitos; FN-kB: factor nuclear- kappa Beta: promueve señales anti-apoptóticas del TNFa; STAT6: transductor de señal y activador de transcripción 6, que activa la proliferación celular por activación de IL-4/IL13; SOCS-1: supresor de señal de citosina 1, que disminuye las quinasas JAK y activa STAT lo que favorece proliferación y supervivencia celular.

Estos hallazgos indicados sugieren que ambas entidades comparten el mismo mecanismo etiopatogénico, por las ventajas de crecimiento y supervivencia que confiere la activación constitutiva de la vía del NF-κB secundaria a una lesión genética.

2. Linfoma anaplásico de células T grandes (LACTG): este linfoma expresa uno de los marcadores del LH clásico (CD30) y se compone de células grandes uni o multinucleadas, con nucleolo prominente, las cuales pueden ser muy parecidas a las variantes uni o multinucleadas del LH. Sin embargo, sus células no están dispersas entre la población inflamatoria, como en LH, sino que crecen en láminas, frecuentemente infiltrando los senos marginales o trabeculares del ganglio comprometido. Algunos casos pueden semejar la variedad EN, histológica y clínicamente, incluyendo nodularidad, bandas de fibrosis, infiltración por granulocitos y compromiso mediastinal en pacientes jóvenes. La diferencia, por lo que su discriminación es de vital importancia, es que no responde de manera óptima a la terapia usada en LH, sino a los esquemas empleados en LNH. El diagnóstico diferencial se efectúa con inmunohistoquímica (CD30+/CD15-/CD20-/CD3+ o -/ CD45+/EMA+/ALK+ en 50% casos/CD43+). PAX5 es positivo en LH y negativo en LACTG. El fenotipo de célula T determina que es un LACTG, aun en casos con morfología de LH y con CD15+. En situaciones necesarias, donde los estudios inmunohistoquímicos no permitan diferenciar entre las dos entidades (otro tipo de linfoma de la "zona gris"), se debe recurrir al análisis molecular para detectar la traslocación t(2;5) que caracteriza al LACTGA y/o el rearrreglo del receptor T.

ETIOLOGÍA DEL LH

Se ha postulado asociación del LH con infección por virus Epstein-Barr (EBV), virus de la hepatitis C, disfunción inmunológica, algunos subtipos de HLA clase II y algunas ocupaciones: personas que trabajan la madera, trabajadores con exposición a solventes orgánicos y pesticidas, estilistas. La asociación más fuerte es con el EBV.

Relación de LH con EBV

La etiología del LH aún se desconoce. Datos epidemiológicos de esta enfermedad en pacientes jóvenes revelan cierta similitud con la epidemiología de algunas infecciones virales como la poliomielitis o la mononucleosis infecciosa, sugiriendo un rol de un determinado agente viral. Los retrovirus han sido los candidatos más fuertes, puesto que muchas leucemias y linfomas están relacionadas con el virus de Epstein-Barr (EBV), el linfoma Burkitt y los virus linfotrópicos T humanos I y II (HTLV), entre otros.

Los datos disponibles favorecen el que se considere al EBV como agente causal en un porcentaje importante de casos. La evidencia de este rol etiológico fue indirecta:

- 1) La observación de un aumento de dos a tres veces el riesgo de LH en personas con historia de mononucleosis infecciosa: se documentó una elevación de anticuerpos contra el antígeno de la cápside viral del EB (VCA) y el antígeno temprano (EA).
- 2) Se encontró que niveles elevados de anticuerpos IgG e IgA contra el VCA y el antígeno nuclear (EBNA) se relacionaban con riesgo relativo

aumentado de desarrollar LH.

Más adelante, se logró establecer evidencia directa:

- 1) Presencia de ADN del EBV en tejido tumoral de LH por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y, más importante, en las células tumorales propiamente dichas, por hibridación *in situ*.
- 2) La presencia de antígenos latentes del EBV marcados con anticuerpos monoclonales, por inmunohistoquímica.
- 3) La demostración de que el EBV está presente en las células tumorales en forma monoclonal, debido a que se demuestra el mismo número de secuencias terminales repetidas del virus en

diversas células de un mismo caso, por *Southern blot*.

Se sabe que existen diferentes patrones de expresión de los antígenos virales si la infección es activa (lítica) o latente. En la infección activa, el EBV está presente en forma linear y hay expresión de antígenos tempranos (EA) y de la cápside (VCA). En la infección latente, la mayoría de los virus se encuentran en forma episomal y expresan los antígenos latentes: nucleares (EBNA 1, 2 y 3), proteínas latentes de membrana (LMP 1, 2, 3) y pequeñas moléculas de RNA (EBER). Como se observa en el Cuadro N° 3, en el linfoma de Hodgkin, el patrón de infección latente es distinto al observado en otros tipos de linfomas.

Cuadro N° 3. Patrones de latencia del EBV en células neoplásicas					
Patrón	EBNA-1	EBNA-2-6	LMP-1-3	EBER	Trastorno
I	+	-	-	+	Linfoma Burkitt
II	+	-	+	+	LH
III	+	+	+	+	Trastornos linfoproliferativos post-trasplante

El desarrollo de anticuerpos monoclonales contra la proteína latente de membrana (LMP-1) ha permitido analizar la presencia del EBV en los casos de linfoma Hodgkin en diferentes poblaciones, por medio de análisis inmunohistoquímico, un método más accesible logística y económicamente para los laboratorios que la hibridación *in situ* o la reacción en cadena de polimerasa (PCR). Se ha encontrado que en Estados Unidos y Europa alrededor de un 50% de los casos de LH es positivo para el EBV. Hay tres factores que parecen afectar esta asociación:

1. El tipo histológico: la EN y la CM tienen EBV en 10-40% y 70%, respectivamente, mientras que el NPL rara vez es positivo y en la DL es casi siempre positivo.
2. La edad: los pacientes en los extremos de la vida tienen mayor tendencia a tener LH EBV (+), mientras que los adolescentes jóvenes que desarrollan LH en los años subsiguientes a mononucleosis infecciosa, sorprendentemente tienen menor proporción de esta asociación. Por otro lado, se indica que en este grupo etario la EN (que expresa el EBV en menor proporción que la CM o la DL) es el tipo histológico más frecuente.
3. Variación geográfica: la frecuencia de expresión del EBV varía entre 23-50% de los casos de LH en países industrializados como Dinamarca

(48%), Inglaterra (28%), Australia (30%), Estados Unidos (36%), Italia (48%) y Francia (33%). En cambio, esta se ha reportado en 70-100% de los casos en países como Kenia (92%), Honduras (100%), Perú (94%), Brasil (72%), Arabia Saudita (87%) y México (77%). En dos estudios donde se analizaron casos de Costa Rica, se encontró una prevalencia de esta asociación sólo en el 36-40%, lo cual es semejante a países industrializados, con una distribución de la asociación parecida por tipo histológico a la descrita en el punto 1. Esto sugiere que la asociación del EBV con LH podría estar determinado más por condiciones del ambiente (condiciones socioeconómicas, exposición temprana al virus, disminución de la vigilancia inmunológica), que por la localización geográfica o la etnicidad.

El rol de EBV en LH permanece en discusión. Puesto que el virus tiene una capacidad de proliferación, transformación e inmortalización de linfocitos B, la conclusión lógica es que este tenga un papel importante en la patogenia del LH. Los estudios epidemiológicos de correlación entre mononucleosis infecciosa (MI) y LH sugieren que ambos son consecuencia de una infección tardía (más allá de la infancia), esto apoyado por los niveles elevados de anticuerpos contra el EBV en algunos pacientes poco tiempo antes del desarrollo del LH. Sin embargo, el hecho de que el EBV no está presente en una buena proporción de casos, causa

duda sobre si tiene un rol etiopatogénico aun en casos positivos. También surge duda porque la población en la que el LH es más frecuente (mujeres jóvenes con nivel socioeconómico elevado, con EN) tiene mayor frecuencia de LH EBV (-), mientras que en las poblaciones en las que el LH es menos frecuente (niños en países subdesarrollados, adultos mayores) hay mayor frecuencia de LH EBV (+). Las tres hipótesis postuladas en los casos de LH EBV (-) son:

1. Que otro virus sea el factor etiopatogénico, lo cual no se ha logrado demostrar hasta el momento.
2. Que el EBV esté involucrado en todos los casos, pero no se detecte con los métodos usados, por limitación de las sondas o por delecciones del genoma viral que oculten el virus, como se ha descrito en algunos casos de linfoma Burkitt; esto fue descartado por estudios de hibridación *in situ* con múltiples sondas.
3. Que el virus no juegue un rol etiopatogénico, sino que sea meramente un epifenómeno, un pasajero pasivo, con presencia evidente debido a un aumento en el reservorio de la población B infectada. Dependería entonces del estado del sistema inmune, tanto el desarrollo del LH, como si este fuera EBV (+) o (-). Así, los pacientes con respuesta inmune normal a hiperreactiva y los

adultos jóvenes con altos niveles socioeconómicos, con historia de MI y con títulos altos de anticuerpos contra EBV, presentan mayor incidencia de LH, pero como poseen niveles bajos de linfocitos B infectados por EBV, tienen mayor probabilidad de desarrollar LH EBV (-). Por el contrario, niños, ancianos, pacientes inmunodeficientes y/o de bajos recursos económicos, poseen una población de linfocitos B infectada por EBV mucho mayor, por lo que, aunque la frecuencia de LH es baja en ellos, la probabilidad de que el LH sea EBV (+) también es mucho mayor.

De tal forma, esta controversia del papel que tiene el EBV en LH aún está por esclarecerse. Algunos autores han encontrado que el estatus de EBV confiere mejor pronóstico en estos pacientes. Así, los pacientes con LH EBV (+) tuvieron mejor sobrevida libre de enfermedad y mayor respuesta completa al tratamiento. Otros autores no obtuvieron evidencia clara de un impacto del estatus del EBV con la sobrevida, incluso a 10 años de seguimiento.

CORRELACIÓN ENTRE EL CUADRO CLINICOPATOLÓGICO Y LAS CITOCINAS

Las células tumorales en el linfoma Hodgkin producen citocinas que controlan a la población celular que las rodea y pueden producir efectos sistémicos. Algunas de estas y sus efectos se detallan en el Cuadro N° 4.

Cuadro N° 4. Relación entre citocinas producidas en el LH y el cuadro clinicopatológico	
Citocina	Característica clinicopatológica
	Síntomas constitucionales
IL-4, IFN-gamma	Células multinucleadas
TGF beta, PDGF	Esclerosis
IL-1, 6, 11	Reacción aguda
IL-3, 5, GM-CSF	Eosinofilia sanguínea y tisular
IL-6, 11, 13, TNF, CD40L	Plasmocitosis
IL-4, 10, TGF beta	Respuesta inmune deprimida
IL-1, 6, 9, TNF, M-CSF	Actividad autocrina
TNF, TGF beta	Linfocitopenia en DL
TARC, MDC	Infusión tisular de linfocitos Th2

IL: interleukina; TNF: factor de necrosis tumoral; IFN: interferón; TGF: factor transformador de crecimiento; PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas; GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos; M-CSF: factor estimulante de colonias de macrófagos; DL: depleción linfocítica; TARC: quimocina relacionada a activación y timo; MDC: quimocina derivada de macrófagos.

Los linfocitos convocados por las células tumorales tienen anergia a la estimulación de algunos mitógenos y a algunos antígenos primarios o secundarios. Además, tienen efecto supresivo sobre los monocitos. Esto parece ser producido por células T secretoras de IL-10 y células T reguladoras CD4+/CD25+.

PRONÓSTICO DEL LH

Independientemente de los subtipos histológicos y de la extensión de la enfermedad, excepto por el compromiso de médula ósea, el LH tiene una tasa de cura general bastante elevada (75%) con los tratamientos actuales.

Los dos parámetros que actúan como factores pronósticos **antes** del tratamiento, independientes por análisis multivariable, son la edad y la extensión de la enfermedad medida por estadio clínico. El subtipo histológico correlaciona con estos dos parámetros:

1. Edad: la supervivencia a 10 años del LH es de 85% o más en pacientes menores de 35 años, del 70% en pacientes entre 35 y 49 años y del 50% o menos en mayores de 50 años.

2. Estadio clínico de la conferencia de Ann Arbor modificado en la conferencia de Cotswolds. La supervivencia a 10 años para el estadio I es de 82%, para el II del 78%, para el III del 62% y para el IV del 41%.

RECAÍDAS EN LH

Aproximadamente un 30% de los casos de LH presentan recaída; 5-13% tendrán recaídas tardías (3-4 años después de la finalización de la terapia).

La probabilidad de recaída aumenta con el estadio avanzado (con presencia de síntomas generales) y con masa mayor a 8 cm. También existen mayores recaídas en la variedad EN y NPL, así como en sitios tratados con radiación.

ROL DE LA BIOPSIA DE MÉDULA ÓSEA EN LH

La incidencia reportada en la literatura de compromiso de médula ósea varía desde < 5-20%. Esta correlaciona con estadio ganglionar avanzado, síntomas B, edad mayor, citopenias periféricas y tipo histológico (Cuadro N° 5). En niños, el porcentaje de infiltración suele ser bastante bajo (1,8%).

Cuadro N° 5. Frecuencia de infiltración de médula ósea según tipo histológico y algunas características histopatológicas		
Tipo LH	Incidencia de infiltración	Características de infiltración
NPL	<5%	No fibrosis.
EN	5-10%	Focal o difuso, fibrosis extensa.
CM	10-20%	---
DL	25-60%	No fibrosis, material eosinófilo.

En general, es muy bajo el porcentaje de pacientes (1-10%) en los que el resultado de la biopsia de médula ósea cambia el esquema terapéutico, ya que los avances en los exámenes de imagenología permiten un estadiaje bastante preciso.

La biopsia por aspiración de médula ósea (MO) es todavía menos útil, probablemente por la fibrosis asociada y las células inflamatorias.

La biopsia bilateral mejora la detección en un 2-17%.

Los requisitos para el diagnóstico de LH en médula ósea son:

1. Sin el diagnóstico de LH previo: células de R-S o L&H, o inmunohistoquímica CD30+ en células de Hodgkin.
2. Con diagnóstico de LH previo: células de Hodgkin en fondo inflamatorio.

El diagnóstico diferencial de infiltración de médula ósea por LH es: linfoma T periférico, linfoma anaplásico de células T grandes y linfoma de células B grandes rico en células T.

RESPUESTA AL TRATAMIENTO Y FUTURAS ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS EN LH

Otro parámetro independiente de pronóstico es la respuesta al tratamiento. Existen casos con resistencia primaria al tratamiento, definida como progresión de la enfermedad durante la terapia inductiva, respuesta transitoria a la terapia inductiva o ausencia de respuesta completa a esta. La resistencia primaria varía desde un 5% hasta un 41% de los casos en diferentes instituciones. Los casos con mayor probabilidad de presentar resistencia primaria son aquellos con enfermedad extraganglionar y con síntomas constitucionales.

Con los avances en los métodos de laboratorio, como el desarrollo de anticuerpos monoclonales para inmunohistoquímica, la microdissección de células aisladas y las sondas para estudios con PCR de las moléculas de Ig y del receptor de células T, se ha podido determinar que el linfoma Hodgkin es una verdadera neoplasia linfoide y que se origina más frecuentemente de linfocitos B, en la fase de centroblastos. Además, se ha logrado determinar que un porcentaje de casos se asocia a infección por el EBV. Esto permitirá, en un futuro no muy lejano, idear nuevos esquemas terapéuticos, que sean más específicos y que tengan efectos menos tóxicos que la radio y quimioterapia. Un ejemplo, podría ser el desarrollo de linfocitos T citotóxicos dirigidos contra los antígenos del EBV expresados en la célula tumoral o inmunoterapia contra el CD30 en el caso de los LH clásicos o contra el CD20 en los casos de LHNPL.

LNH Y LH EN PACIENTES CON INFECCIÓN POR VIH

En pacientes con VIH, la incidencia de LNH aumenta conforme disminuye el conteo de linfocitos CD4+, por lo que estos se observan en las fases más tardías de la enfermedad. Los linfomas no Hodgkin más frecuentes en estos pacientes son: linfoma difuso de células B grandes, linfoma Burkitt, linfomas de bajo grado (hasta 14 veces más frecuente que la población general) y linfomas T. El riesgo de LH también se encuentra aumentado en esta población (5-15 veces más frecuentes que la población general), aunque es más común el LNH; se reporta una relación LNH/LH de 3,9 para los pacientes VIH- y de 6,9 para los pacientes VIH+.

El advenimiento del tratamiento antiretroviral ha provocado una disminución de la incidencia de LNH, debido a la mejoría en la inmunidad. Sin embargo, el aumento en el conteo de linfocitos CD4 ha correlacionado con un aumento de la incidencia de LH. Este aumento se da tal vez por el influjo de células inflamatorias que conservan el microambiente necesario para la sobre-

vida de las células de Reed-Sternberg y sus variantes.

Las variedades de LH más frecuentes en los pacientes VIH+, antes del tratamiento antiretroviral, son las formas agresivas: 54% de CM, 54% de DL y 37% de EN, lo cual contrasta con lo reportado en la población inmunocompetente, de alrededor del 70% de casos de EN; es decir, la variedad que más baja en presentación conforme baja la inmunidad es la EN. El tratamiento con retrovirales aumenta la inmunidad y, a la vez, el riesgo de estos pacientes VIH+ de presentar LH EN.

La mayoría de los casos de LH en pacientes VIH+ se presenta en hombres, en estadios avanzados (70%), con síntomas constitucionales, lo mismo que el compromiso de médula ósea y/o de sitios extranodales. Se documenta una baja incidencia de presentación en mediastino (13% comparada con un 71% en el LH en población inmunocompetente). El tratamiento logra una remisión completa en 79% de los pacientes, pero con complicaciones hematológicas e infecciosas frecuentes. Andrieu *et al* reportaron una sobrevida a dos años de 71% para pacientes con conteos iniciales de CD4 mayores de 300/mL y de 0% para aquellos con menos de 300/mL, y una sobrevida general de 41%.

RESUMEN

- El linfoma Hodgkin es una neoplasia linfoide maligna, caracterizada por la presencia de escasas células tumorales dispersas en un fondo de células inflamatorias no tumorales.
- La célula tumoral se conoce como célula de Reed-Sternberg. Según su morfología, también se le llama célula de Hodgkin, célula lacunar, entre otros.
- La célula de Reed-Sternberg se origina de linfocitos B centrofoliculares y expresan los antígenos CD15 y CD30.
- El linfoma Hodgkin se clasifica en: linfoma Hodgkin clásico (con sus subtipos) y linfoma Hodgkin nodular de predominio linfocítico.
- El linfoma Hodgkin nodular de predominio linfocítico tiene una morfología, inmunofenotipo y evolución clínica distintiva del linfoma Hodgkin clásico. La célula tumoral del LHNPL es la célula L&H que se caracteriza por la expresión del antígeno CD20.
- Alrededor de un 80% de todos los casos de linfoma Hodgkin son del subtipo esclerosis nodular.
- El linfoma Hodgkin está claramente asociado a infecciones por el virus de Epstein-Barr. En general, se logra demostrar la presencia del virus en alrededor de un 50% de los casos. Sin embargo, la frecuencia del virus en casos de LHC varía según el área geográfica.

BIBLIOGRAFÍA

- Andrieu JM, Lu W, Levy R. Sustained increases in CD4 cell counts in asymptomatic human immunodeficiency virus type 1-seropositive patients treated with prednisolone for 1 year. *J Infect Dis* 1995; 171(3): 523-530.
- Bhagat SK, Medeiros LJ, Weiss LM, Wang J, Raffeld M, Stetler-Stevenson M. bcl-2 expression in Hodgkin's disease: correlation with the t(14;18) translocation and Epstein-Barr virus. *Am J Clin Pathol* 1993; 99(5): 604-608.
- Bräuninger A, Wacker HH, Rajewsky K, Küppers R, Hansmann ML. Typing the histogenetic origin of the tumor cells of lymphocyte-rich classical Hodgkin's lymphoma in relation to tumor cells of classical and lymphocyte-predominance Hodgkin's lymphoma. *Cancer Res* 2003; 63(7): 1644-1651.
- Correa P, O'Connor G. Epidemiologic patterns of Hodgkin's disease. *International Journal of Cancer* 1971; 18(2): 192-201.
- Diehl V, von Kalle C, Fonatsch C, Tesch H, Jüecker M, Schaadt M. The cell of origin in Hodgkin's disease. *Sem Oncol* 1990; 17(6): 660-672.
- Gupta RK, Lister TA, Bodmer JG. Proliferation of Reed-Sternberg cells and variants in Hodgkin's disease. *Ann Oncol* 1994; 5(Suppl. 1): S117-S119.
- Gutiérrez A CH. Linfoma Hodkin. En: Guzmán S, Cedillo F. Fundamentos para el ejercicio de la medicina: guía para el examen de residencia médicas. México: Manual Moderno; 2012.
- Harris NL. Hodgkin's disease: classification and differential diagnosis. *Mod Pathol* 1999; 12(2): 159-176.
- Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Müller-Hermelink HK, Vardiman J, *et al.* The World Health Organization classification of hematological malignancies report of the Clinical Advisory Committee Meeting, Airlie House, Virginia, November 1997. *Mod Pathol* 2000; 13(2): 193-207.
- Hinz M, Lemke P, Anagnostopoulos I, Hacker C, Krappmann D, Mathas S, *et al.* Nuclear factor kappaB-dependent gene expression profiling of Hodgkin's disease tumor cells, pathogenetic significance, and link to constitutive signal transducer and activator of transcription 5 a activity. *J Exp Med* 2002; 196(5): 605-617.
- Inghirami G, Frizzera G. Role of the bcl-2 oncogene in Hodgkin's disease. *Am J Clin Pathol* 1994; 101(6): 681-683.
- Jarrett RF, Stark GI, White J, Angus B, Alexander FF, Krajewski AS, *et al.* Impact of tumor Epstein-Barr virus status on presenting features and outcome in age-defined subgroups of patients with classic Hodgkin lymphoma: a population-based study. *Blood* 2005; 106(7): 2444-2451.
- Kanzler H, Küppers R, Hansmann ML, Rajewsky K. Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease represent the outgrowth of a dominant tumor clone derived from (crippled) germinal center B cells. *J Exp Med* 1996; 184(4): 1495-1505.
- Küppers R, Rajewsky K, Zhao M, Simons G, Laumann R, Fischer R, *et al.* Hodgkin disease: Hodgkin and Reed-Sternberg cells picked from histological sections show clonal immunoglobulin gene rearrangements and appear to be derived from B cells at various stages of development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91(23): 10962-10966.
- Leoncini L, Spina D, Close P, Minacci C, Megha T, De Luca F, *et al.* Mitotic activity and nuclear DNA damage of large cells in Hodgkin's disease: comparison with the expression of p53 and bcl-2 proteins and the presence of Epstein-Barr virus. *Leuk Lymphoma* 1997; 25(1-2): 153-161.
- Marafioti T, Hummel M, Foss HD, Laumen H, Korbjuhn P, Anagnostopoulos I, *et al.* Hodgkin and Reed-Sternberg cells represent an expansion of a single clone originating from a germinal center B-cell with functional immunoglobulin gene rearrangements but defective immunoglobulin transcription. *Blood* 2000; 95(4): 1443-1450.
- Monterroso V, Zhou Y, Koo S, Glackin C, Bujan W, Medeiros JL. Hodgkin's disease in Costa Rica: a report of 40 cases analyzed for Epstein-Barr virus. *Am J Clin Pathol* 1998; 109(5): 618-624.
- National Cancer Institute. SEER Cancer Statistics Factsheets: Hodgkin lymphoma. (Versión en Internet). Bethesda, MD: National Cancer Institute; 2013. Consultado en: <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/hodg.html>
- Poppema S, Potters M, Visser L, van den Berg AM. Immune escape mechanisms in Hodgkin's disease. *Ann Oncol* 1998; 9(Suppl 5): S21-S24.
- Rüdiger T, Ott G, Ott MM, Müller-Deuberts SM, Müller-Hermelink HK. Differential diagnosis between classic Hodgkin's lymphoma, T-cell-rich B-cell lymphoma and paragranuloma by paraffin immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol* 1998; 22(10): 1184-1191.
- Stein H, Hummel M. Cellular origin and clonality of classic Hodgkin's lymphoma: immunophenotypic and molecular studies. *Sem Hematol* 1999; 36(3): 233-241.
- Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, *et al.* WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4 ed. Lyon: IARC; 2008.
- Tsimberidou AM, Sarris AH, Medeiros LJ, Mesina O, Rodríguez MA, Hagemeister RB, *et al.* Hodgkin's disease in patients infected with human immunodeficiency virus: frequency, presentation and clinical outcome. *Leuk Lymphoma* 2001; 41(5-6): 535-544.
- Weiss LM, Movahed LA, Warnke RA, Sklar J. Detection of Epstein-Barr viral genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *N Engl J Med* 1989; 320(8): 502-506.

Dr. Malcolm Acón Laws
Dra. Victoria Monterroso Azofeifa (†)

INTRODUCCIÓN

Los linfomas no Hodgkin (LNH) son aquellas proliferaciones linfoides malignas que no corresponden al grupo del linfoma Hodgkin. Son neoplasias que resultan de la expansión “clonal” de:

- 1) Linfocitos B, en algún punto de sus vías de diferenciación.
- 2) Linfocitos T, en algún punto de sus vías de diferenciación.

Se localizan en alguno de los compartimentos del tejido linfoide primario (médula ósea y timo) o del tejido linfoide secundario (ganglios, bazo y tejido linfoide extraganglionar) y se van expandiendo. Aunque también se dan casos de linfoma en tejidos extranodales (sistema nervioso central -SNC-, piel, etc.).

La proliferación “clonal” es el resultado de un aumento en la capacidad proliferativa o de supervivencia de una sola célula y su progenie, lo que le confiere ventaja biológica sobre las otras células de la misma población. Las alteraciones en neoplasias generalmente resultan de: translocaciones cromosómicas, mutaciones de punto, amplificación de genes o deleciones de estos. Sin embargo, en los LNH la alteración genética más consistente es la translocación cromosómica; esta causa el traslado de un oncogén celular a una zona adyacente del promotor de los genes receptores linfoides. La expresión aumentada del producto del oncogén provoca una ventaja proliferativa o de supervivencia del linfocito portador de la translocación. Eventos genéticos adicionales, como mutaciones de otros oncogenes o de los genes supresores de tumores, le conferirían el fenotipo neoplásico y determinarían la agresividad del linfoma.

En Occidente, la mayoría de los LNH se originan de linfocitos B (alrededor del 85%). Los linfomas T representan un menor porcentaje. En Costa Rica, entre los años 2011 y 2013, los linfomas de células B representaron el 70% de los LNH en un hospital general (Hospital México).

A pesar de su origen en un mismo tipo de célula (el

linfocito B o T), existen muchos subtipos de linfomas B y T, con características biomoleculares, histológicas y clínicas diversas, ya que se originan en distintas etapas de diferenciación y maduración de esas poblaciones linfoides. Reconociendo esto, en la última clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2008) se agruparon los linfomas que comparten características no solo morfológicas y de supervivencia con respecto a los esquemas de quimioterapia de los años 70, como en la clasificación de linfomas de la Formulación de Trabajo para Uso Clínico, sino también características clínicas, inmunológicas y moleculares. Esto se hizo con el fin de agrupar dentro de cada categoría a entidades lo más similares posibles, que proporcionen información útil para las decisiones terapéuticas y para predicciones pronósticas, lo cual es posible gracias al desarrollo, en la última década, de métodos de laboratorio que permiten establecer las características inmunológicas y moleculares de cada patología.

Aun con las grandes diferencias que existen entre las diversas categorías de los LNH, hay características en común que los distinguen del linfoma Hodgkin (LH):

- γ No es posible predecir, como en el LH, el progreso de la neoplasia por territorios según el curso de la circulación linfática. Así, en el linfoma no Hodgkin puede haber compromiso de tracto gastrointestinal y del anillo de Waldeyer, o de ganglio cervical e inguinales, por ejemplo, sin aparente compromiso de ningún otro sitio intermedio. Por esto, la utilidad de la clasificación por estadios clínicos es menos evidente. Sin embargo, esta se sigue utilizando, porque provee una forma estandarizada de comparar datos y un lenguaje descriptivo común para estudios científicos.
- γ El compromiso de tejidos extraganglionares es mucho más frecuente en los LNH que en el LH: representa el 24% en EUA, el 28% de los casos en Finlandia, el 36% en Israel y el 48% en Italia. En cambio, en el LH el compromiso extraganglionar es de menos del 1%. Los sitios extraganglionares más frecuentemente comprometidos, si se excluye el anillo de Waldeyer, que algunos autores consideran es tejido linfoide secundario, son: tracto gastrointestinal, piel, hueso, pulmón y cerebro.

- γ La población tumoral de los LNH predomina sobre otras poblaciones ganglionares, con una excepción: el linfoma de células B grandes rico en células T, una variante del linfoma B de células grandes, en que hay algunas células neoplásicas grandes de inmunofenotipo B dispersas entre un mar de linfocitos pequeños T benignos.
- γ Compromete con frecuencia ganglios periféricos y sitios poco comunes en LH, como anillo de Waldeyer o ganglios mesentéricos.

INCIDENCIA

En Estados Unidos, en 1993, los LNH representaron un 3% de todos los tumores y de la mortalidad por estos: alrededor de 43.000 casos nuevos y más de 20.000 muertes. La tasa de incidencia anual aumentó de 5,9/100.000 habitantes en 1950 a 13,7/100.000 habitantes en 1989, lo que representó un alza del 3,3% anual. Cabe mencionar que dicha alza no puede ser atribuida únicamente a los linfomas asociados al sida.

En Costa Rica, según la incidencia de todos los tumores en el año 2010, los linfomas se ubicaron en el quinto lugar en hombres y en octavo lugar en mujeres. La tasa de incidencia pasó de 4,2 por 100.000 habitantes en 1994 a 8,2 por 100.000 habitantes en 2010, según el Registro Nacional de Tumores, tomando en cuenta solo los linfomas de ubicación en ganglio. En ese mismo año, el linfoma ganglionar ocupó un 8º lugar en mortalidad en hombres. En el bienio 2011-2013 se diagnosticaron 434 linfomas en un hospital general (Hospital México), con un promedio de 217 casos por año. De estos, los LNH representaron el 78,5% de todos los casos. Del 2006 al 2013, en este mismo hospital, los linfomas aumentaron en un 155%.

LINFOPOYESIS

El desarrollo de linfocitos T y B se origina a partir de células madre, en un proceso complejo. Durante su maduración, estos linfocitos adquieren, temporal o permanentemente, la expresión de proteínas, que son específicas para la etapa de la maduración y para el tipo celular. Estas proteínas han sido el blanco de estudios inmunocitoquímicos e inmunohistoquímicos, para esclarecer los eventos que conducen al desarrollo de las poblaciones de linfocitos.

Desarrollo de los linfocitos B

Los linfocitos se comprometen a ser de linaje B o T antes o poco después de migrar a los órganos linfoides primarios, donde terminan su maduración. El órgano linfoide primario, en el caso de los linfocitos B, es la

médula ósea, y en el caso de los linfocitos T, el timo. La producción de linfocitos B se inicia en el hígado fetal alrededor de la novena semana de gestación y continúa en la médula ósea.

Los linfocitos B constituyen la principal población que provee al organismo de inmunidad humoral. Su función consiste en producir inmunoglobulinas (Ig).

Específicamente, el desarrollo de los linfocitos B se puede dividir en dos etapas:

1. Linfopoyesis B independiente de antígeno. El linfocito B más temprano se denomina pro-B. Aún no presenta rearreglo del gen de la inmunoglobulina. Se desarrolla de una célula precursora HLA-DR+, que adquiere la expresión del CD19 y subsecuentemente del CD20 y del CD10. Después, presenta rearreglo del gen de la Ig, con expresión de cadenas pesadas μ en el citoplasma. En esta etapa se denomina linfocito pre-B. El siguiente paso es el rearreglo de la cadena liviana, con la consecuente expresión de la Ig completa en la superficie celular. Al ocurrir esto, el CD10 se deja de expresar; en esta etapa se denomina linfocito B inmaduro. Los linfocitos B que reconocen antígenos propios son eliminados o entran en anergia. Los linfocitos B que no reconocen antígenos propios sufren un nuevo rearreglo de la cadena δ , con la subsiguiente coexpresión de IgD. Estos se denominan linfocitos B vírgenes y pueden ser CD5- o CD5+. Los linfocitos B CD5+ son longevos y no suelen entrar en respuesta inmune; representan alrededor del 15% de los linfocitos circulantes. Ambas subpoblaciones, CD5+ y CD5-, migran a los órganos linfoides secundarios (ganglios linfáticos, bazo, anillo de Waldeyer, tejido linfoide asociado a mucosas) y se alojan en los folículos linfoides primarios o en la zona del manto. Los linfocitos B vírgenes CD5- son los precursores de los linfocitos B centrofoliculares.

2. Maduración del linfocito B dependiente de antígeno. En los órganos secundarios, los linfocitos B entran en contacto con antígenos, lo que produce su activación y maduración. Esto conduce a la transformación del linfocito a célula plasmática productora de Ig o a linfocito B de memoria, por medio de tres tipos de modificaciones del ADN genómico:

- a. “Switch” (cambio) de la clase de la cadena pesada de Ig: la mayoría de los linfocitos B estimulados por antígeno sufren un “switch” de cadenas pesadas μ y δ a los demás isotipos (γ , α , ϵ).

- b. **Hipermutación somática de la región variable:** este proceso puede aumentar la afinidad de la región variable de la Ig, independiente del rearreglo del gen. Esto se logra predominantemente por la introducción de una alta tasa de mutaciones de punto, pero también por delecciones o duplicaciones en los genes de la región variable de las cadenas pesada y liviana de la Ig. El 90% de los linfocitos periféricos han sufrido hipermutación somática; el resultado es mayor o menor afinidad para el antígeno. Los linfocitos B con mayor afinidad sobrevivirán y los de menor afinidad sufrirán apoptosis (muerte celular programada).
- c. **Edición del receptor:** un hallazgo reciente demostró que puede haber edición del receptor por nuevas recombinaciones de los segmentos variables (V), de diversidad (D) y de unión (J) de los genes de la Ig. El CD40 en los linfocitos B y en las células foliculares dendríticas (histiocitos tisulares especializados, localizados en los centros germinales de los folículos linfoides) sirve como señal secundaria para la generación de linfocitos B de memoria. Por otro lado, el CD23 soluble y la interleukina-1 α parecen dar la señal para la vía alterna, de transformación a plasmablasto y luego a célula plasmática. Una vez que se crea un linfocito B con gran afinidad para un antígeno, este es expandido por proliferación acelerada. Esto, junto con los procesos moleculares arriba anotados, puede dar origen a neoplasias, por errores en los controles de dichos procesos.

Desarrollo de los linfocitos T

Los linfocitos T tienen una vida media mayor que la de los linfocitos B y constituyen la mayoría de la población circulante en la sangre periférica y en la linfa. Recirculan y migran a las zonas parafooliculares de los órganos linfoides secundarios (ganglios linfáticos, bazo, anillo de Waldeyer, tejido linfoide asociado a mucosas de tracto gastrointestinal y pulmón). Sus funciones principales son suministrar la respuesta inmunológica celular y cooperar en la respuesta inmunológica humoral. Estas funciones son efectuadas por diferentes subpoblaciones de linfocitos T. La subpoblación T que expresa CD8 tiene funciones citotóxicas o de supresión e interactúa con antígenos de compatibilidad mayor tipo I. La subpoblación T que expresa CD4 tiene función ayudadora de inmunidad humoral o inductora e interactúa con antígenos de histocompatibilidad II. Ambas poblaciones expresan el receptor de linfocitos T (TCR, por su nombre en inglés).

El TCR está compuesto por cadenas $\alpha\beta$ (en el 95% de los linfocitos) o $\gamma\delta$. Al igual que la molécula de Ig, el TCR puede obtener gran variabilidad, por rearreglo al azar de la región variable, de diversidad y de unión de sus genes. Este receptor se asocia en forma no covalente con otro marcador T, el CD3, el cual es capaz de estimular la producción de interleukina-2. Otros marcadores de linfocitos T son: CD1, CD2, CD5, CD7 y CD9.

El marcador TdT (deoxinucleotidil-transferasa terminal) es una proteína de 58 kD, que funciona como enzima nuclear especializada, encargada de catalizar la incorporación al azar de desoxi-nucleótidos en el extremo hidroxil 3' de una cadena separada de ADN, independientemente del código genético de dicha cadena; está expresado en precursores T y B. No se expresa en células B y T maduras de sangre periférica o tejidos. Se encuentra en casi todos los linfomas/leucemias linfoblásticas T y B, y en algunos casos de leucemia mieloide aguda (LMA), sobre todo las de tipo FAB MO.

La ontogenia de los linfocitos T empieza aún antes de su migración al timo. Ya en la séptima semana de gestación se identifican linfocitos CD3+ citoplasmático/ CD7+/ TdT- en el hígado fetal, denominados pro-linfocitos. El CD7 es el primer antígeno de células T que aparece. Una vez que migran al timo se denominan timocitos inmaduros; siguen teniendo ese inmunofenotipo y son doble negativos (CD4-/ CD8-), pero ya expresan CD2 y TdT (deoxi-nucleotidil-transferasa terminal). Los timocitos comunes constituyen la siguiente etapa y tienen rearreglo de la cadena β del TCR, por lo que la expresan en el citoplasma. Como el rearreglo de la cadena α todavía no sucede, no expresan aún el TCR completo. Sin embargo, ya coexpresan CD4 y CD8 (doble positivos) y CD1. La siguiente etapa es de timocitos maduros; aquí expresan solo CD4 o CD8, pero ya expresan el TCR completo, pierden la expresión de TdT y del CD1 y expresan CD3 en la superficie. Subpoblaciones de linfocitos T maduros también expresan CD43 y CD45RO.

Los linfocitos T citotóxicos y las células asesinas naturales (NK, por sus siglas en inglés) cuentan con un precursor común. Debido a eso, los linfomas derivados de estos dos tipos de células exhiben características clínicas, histológicas e inmunofenotípicas en común: usual localización extranodal, frecuentes áreas de necrosis y/o apoptosis, y presencia de gránulos citotóxicos.

CLASIFICACIÓN DE LINFOMAS NO HODGKIN

La clasificación de los LNH ha presentado una reevaluación significativa en los últimos años. La morfología (citología y patrón histológico) sigue siendo el punto de arranque. Sin embargo, las características inmunohistoquímicas, moleculares, citogenéticas y clínicas (edad, sexo, sitio de presentación, expresión leucémica, tipo de alteración genética, presencia de otras mutaciones adicionales), son fundamentales para un diagnóstico preciso. Esto se ha tomado en cuenta en la última clasificación para neoplasias hematológicas. Se consideran todas o casi todas las características para una adecuada clasificación, pero la importancia relativa de cada una de estas varía según la entidad. Algunas se definen por morfología, como el linfoma folicular, el linfoma T angioinmunoblástico o la variedad de esclerosis nodular del linfoma Hodgkin. Otras tienen un inmunofenotipo específico, sin el que no es posible hacer el diagnóstico, como el linfoma de linfocitos pequeños, el linfoma de células del manto y el linfoma de células T grandes anaplásicas. En ciertos linfomas la anomalía genética específica es un criterio relevante para el diagnóstico: la translocación t(11;14) en el linfoma de la células del manto, la translocación t(14;18) en el linfoma folicular o las translocaciones t(8;14) o (2;8) u (8;22) en el linfoma Burkitt; mientras que en otros no hay anomalías genéticas específicas comunes a todos los casos, como el linfoma de la zona marginal, tipo MALT o el linfoma difuso de células B grandes. Otros requieren conocer datos clínicos, como la localización, ya que los linfomas originados en ganglios son distintos a los originados en tejido linfoide extraganglionar, aunque sean histológicamente similares, como los linfomas MALT o los linfomas T periféricos. Para el diagnóstico del linfoma de células B

grandes del mediastino, también es importante saber la localización mediastinal.

El linfoma más frecuente de todos, según un estudio de 1.300 casos de LNH de varios centros del mundo, evaluados por cinco expertos diferentes, es el linfoma difuso de células B grandes, seguido por el linfoma folicular; ambas categorías representaron el 50% de los LNH analizados. Estas dos categorías son entidades fáciles de reconocer; sin embargo, el 27% de los casos en esa misma casuística corresponden a entidades nuevas, que no estaban contempladas en la formulación de trabajo para uso clínico, vigente en los años ochenta. Dentro de este grupo se encuentran: el linfoma de la zona marginal, tipo MALT (8%), el linfoma de la célula del manto (7%), el linfoma T periférico (6%), el linfoma de la zona marginal, el nodal (2%), el linfoma difuso de células B grandes del mediastino (2%) y el linfoma anaplásico de células T grandes (2%).

El Cuadro N° 1 muestra la clasificación de los LNH elaborada por la OMS. En este se puede observar que la división inicial de los LNH es el origen B o T de los linfocitos tumorales, lo cual requiere de caracterización inmunohistoquímica o por citometría de flujo. La segunda división importante es entre los linfomas derivados de linfocitos inmaduros (precursores) T o B de los linfomas originados en linfocitos maduros. Los linfocitos precursores expresan TdT y CD10 (CALLA); pueden comportarse como leucemias o linfomas y requieren esquema de quimioterapia agresivo, con enfoque adicional al sistema nervioso central, por el riesgo del alojamiento de células tumorales en este, al que no llega la quimioterapia convencional, debido a la barrera hematoencefálica.

Cuadro N° 1. Clasificación de neoplasias linfoides, OMS 2008
Neoplasias de células precursoras linfoides
Neoplasias de células precursoras B. Linfoma/leucemia linfoblástica de células precursoras B. Leucemia linfoblástica aguda de células precursoras B. Neoplasias de células precursoras T. Linfoma/leucemia linfoblástica de células precursoras T. Leucemia linfoblástica aguda de células precursoras T.
Neoplasias de células b maduras

Cuadro N° 1. Clasificación de neoplasias linfoides, OMS 2008

Leucemia linfocítica crónica B/ Linfoma de células pequeñas.
 Leucemia prolinfocítica B.
 Linfoma linfoplasmocítico.
 Linfoma esplénico de la zona marginal (con o sin linfocitos vellosos).
 Tricoleucemia (leucemia de células peludas).
 Neoplasias de células plasmáticas.
 Linfoma de la zona marginal extranodal, tipo MALT.
 Linfoma de la zona marginal nodal.
 Linfoma folicular.
 Linfoma de centro folicular primario cutáneo.
 Linfoma de la célula del manto.
 Enfermedades de cadenas pesadas.
 Linfoma difuso de células B grandes (LDCBG).
 LDCBG asociado a inflamación crónica.
 Granulomatosis linfomatoide.
 Linfoma de células grandes B mediastinal (tímico).
 Linfoma intravascular de células B grandes.
 Linfoma de células B grandes positivas para ALK.
 Linfoma plasmablastico.
 Linfoma de células B grandes surgiendo en enfermedad de Castleman multicéntrico asociado a HHV8.
 Linfoma primario de efusión.
 Linfoma Burkitt.
 Linfoma de células B, no clasificable, con características intermedias entre LDCBG y linfoma Burkitt.
 Linfoma de células B, no clasificable, con características intermedias entre LDCBG y linfoma Hodgkin.

Neoplasias de células T maduras

Leucemia prolinfocítica T.
 Leucemia linfocítica células T granulares grandes.
 Leucemia agresiva de células NK.
 Enfermedad linfoproliferativa de la infancia positiva para virus de Epstein-Barr.
 Leucemia/ Linfoma T del adulto.
 Linfoma T/NK extraganglionar, tipo nasal.
 Linfoma T intestinal asociado a enteropatía.
 Linfoma T hepatoesplénico.
 Linfoma T subcutáneo tipo paniculítico.
 Micosis fungoides.
 Síndrome de Sézary.
 Desórdenes linfoproliferativos de células T positivas para CD30, primarios cutáneos.
 Linfoma de células T periférico, primario cutáneo, subtipos raros.
 Linfoma anaplásico de células grandes T, positivo para ALK.
 Linfoma anaplásico de células grandes T, negativo para ALK.
 Linfoma T periférico, de ningún tipo específico.
 Linfoma angioinmunoblástico T.

LINFOMAS DE CÉLULAS PRECURSORAS LINFOIDES**Linfoma/leucemia de linfocitos precursores B**

Esta neoplasia es más común en niños. Representa el 80% de las leucemias linfoblásticas agudas y el 20% de los linfomas linfoblásticos. La célula tumoral es idéntica en ambas presentaciones clínicas; para

diferenciarlas se estableció el siguiente parámetro: si hay más de 10% de linfoblastos circulantes o más del 25% de linfoblastos en médula ósea, se denomina leucemia.

La morfología de las que expresan marcadores T y las que expresan marcadores B, también es idéntica, excepto por los métodos de laboratorio utilizados: citometría de flujo o inmunohistoquímica.

El patrón de crecimiento es difuso, monótono, con frecuente extensión al tejido extraganglionar y con infiltración de tejidos blandos en “fila india”. Los linfoblastos son de tamaño intermedio, con núcleo redondo o circunvuelto, cromatina fina, nucléolos inconspicuos y citoplasma muy escaso, levemente basofílico. Sin embargo, hay variantes con núcleos más grandes y nucléolos distinguibles a prominentes. Las mitosis son abundantes; puede verse “imagen en cielo estrellado” por la presencia de macrófagos dispersos entre la población tumoral, con detritos celulares en su citoplasma.

Inmunohistoquímicamente, expresan TdT, CD19, CD20, CD22 y CALLA (CD10). El inmunofenotipo inmaduro se refleja en el patrón de expresión de la inmunoglobulina: la célula pre-pre-B no expresa Ig y la célula pre-B expresa Ig solo en el citoplasma. Muy raros casos expresan Ig de superficie, lo que hace difícil de distinguirla de la variante blástica del linfoma de la célula del manto, excepto que expresa TdT y CALLA.

Por lo general, se presentan como linfadenopatías o tumores en piel, tejidos blandos, hueso, amígdalas o ganglios, ya que el compromiso mediastinal en el linfoma linfoblástico B es menos frecuente que en el linfoma linfoblástico de inmunofenotipo T. Además, tiene poca tendencia a progresar a fase leucémica.

Es un linfoma muy agresivo, pero se logra curar hasta en el 50% de los casos con quimioterapia que incluya aplicación intratecal, para evitar las recurrencias. Aun los estadios localizados deben tratarse con esquemas de quimioterapia de leucemia, para lograr una sobrevida libre de enfermedad del 85%.

Neoplasias de precursores de linfocitos T

- Linfoma linfoblástico T/leucemia linfoblástica aguda T

La única forma de distinguir esta entidad de la leucemia/linfoma linfoblástico B es por análisis del inmunofenotipo. Como en los casos de neoplasias de células precursoras B, las leucemias y los linfomas linfoblásticos son una misma entidad en extremos opuestos del espectro. La imagen histológica es indistinguible del linfoma linfoblástico B (Figura N° 1). En la mayoría de los casos, el inmunofenotipo es de CD7+/CD3+ citoplasmático/CD43+, con variable expresión del CD2 y CD5. Pueden ser $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$ o negativos para el receptor de células T. Típicamente son TdT+. Con frecuencia son CD4, CD8 doblemente positivos o negativos y pueden expresar CD1. Algunos casos pueden expresar marcadores NK (CD16, CD57) y tendrán un comportamiento más agresivo.

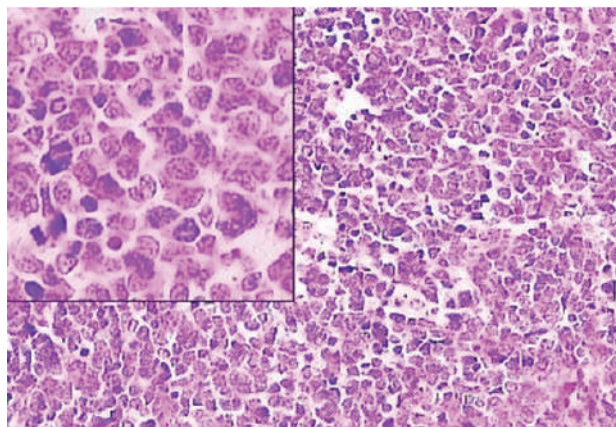


Figura N° 1. H&E, 20x. Linfoma linfoblástico. El patrón de crecimiento es difuso. Las células linfoides son de tamaño intermedio, con escaso citoplasma, lo que da imagen de núcleos superpuestos. Los contornos nucleares son irregulares.

Predominan en adolescentes y adultos jóvenes, aunque en forma ocasional se presentan en adultos mayores, y con mayor frecuencia en hombres. Constituyen el 85% de los linfomas linfoblásticos, el 40% de los linfomas en niños y el 15% de las leucemias. La presentación usual es de una masa de crecimiento rápido en mediastino, con signos compresivos, con o sin linfadenopatías periféricas, usualmente supraclaviculares, con o sin

derrame pleural. Si no es tratada, el paciente fallece, con frecuente compromiso del SNC y fase leucémica.

LINFOMAS DE LINFOCITOS B MADUROS

Las primeras nueve categorías de las neoplasias de linfocitos B reúnen linfomas o leucemias derivadas de linfocitos de tamaño pequeño y/o del folículo linfoides o

de las zonas relacionadas a este: la zona del manto y la zona marginal. Debido a que las leucemias se analizan en otro capítulo, a continuación se detallarán solo las primeras siete categorías, que atañen a linfomas.

Linfoma de linfocitos pequeños/leucemia linfocítica crónica (LLC)

La diferencia entre estas dos entidades es arbitraria. Por convención, se designa como portador de LLC a aquel paciente que tenga una cifra absoluta de linfocitos superior a 5 mil/mm³ y más del 30% de linfocitos en el aspirado de médula ósea.

El linfoma de células pequeñas, por su parte, constituye alrededor del 5% de los LNH. Es el linfoma que tiene la edad media de presentación más alta de todos los LNH, la cual es aproximadamente de 60 años. Rara vez se presenta en niños. Usualmente, hay linfadenopatías generalizadas. Los pacientes por lo general se encuentran en estadio IV, casi siempre por infiltración de la médula ósea. También es frecuente la hepatoesplenomegalia. El curso es indolente, aun en pacientes no tratados (sobrevivida del 51% a cinco años), pero en pocos casos se logra la erradicación de la enfermedad, independientemente de si se

administra quimioterapia agresiva o no. Es decir, es una neoplasia de bajo grado de malignidad, pero incurable. Entre un 10% y un 20% de los pacientes desarrollarán fase leucémica. El 10% sufrirá transformación a un linfoma de células grandes, lo que se ha denominado síndrome de Richter; esta transformación es de muy mal pronóstico. En raros casos, puede haber transformación a linfoma Hodgkin.

Los ganglios comprometidos siempre tienen un patrón de infiltración difuso, por lo que no es necesario agregar el término “difuso” en el diagnóstico. Los linfocitos proliferantes son pequeños, con núcleos redondos o levemente irregulares, con cromatina grumosa, densa. En el 90% de los casos se identifican zonas vagamente nodulares dentro de la proliferación difusa, compuestas por linfocitos, prolinfocitos y parainmunoblastos (Figura N° 2). Estos dos últimos tienen el núcleo más grande, la cromatina más vesiculosa y nucléolos visibles a prominentes; el parainmunoblasto tiene el citoplasma más abundante. Las mitosis son infrecuentes en las zonas con linfocitos pequeños, y frecuentes en las zonas nodulares, conocidas como centros de proliferación o pseudofolículos. En general, no hay histiocitos, eosinófilos o neutrófilos acompañando a esta población.

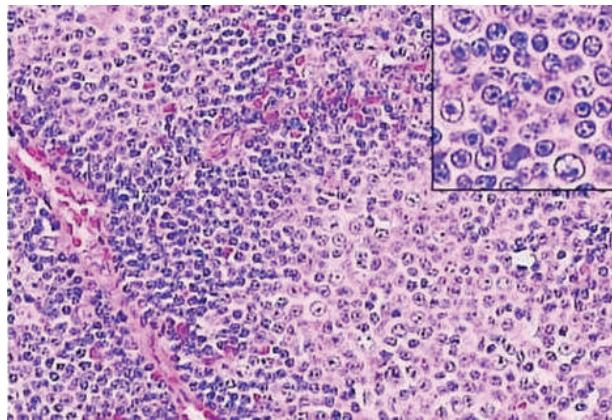


Figura N° 2. H&E, 20x: Linfoma de células pequeñas: proliferación difusa de linfocitos pequeños, de núcleo redondo, con cromatina grumosa, entre los que se identifican pseudofolículos o centros de proliferación. Estos contienen mayor cantidad de las otras dos células que proliferan en este tipo de linfoma: los prolinfocitos y los parainmunoblastos (recuadro, 40x).

En análisis inmunohistoquímicos, los linfocitos expresan CD20, uno de los marcadores pan-B. En el 75% de los casos coexpresan dos marcadores pan T, el CD5 y el CD43. Esta coexpresión aberrante es muy útil en el diagnóstico del linfoma. El CD23, otro marcador pan B, también es útil, pues no está expresado en el linfoma de la célula del manto, con el que hay que hacer diagnóstico diferencial. No expresan CD10 (Cuadro N° 2).

Por citometría de flujo o inmunohistoquímica de tejido no fijado, se logra demostrar la expresión débil de IgM, IgD e IgG en la superficie de los linfocitos. Por estas características es posible que este linfoma se origine en los linfocitos B CD5+ circulantes. Como algunos tienen mutaciones de la región variable, que es característico de células centrofoliculares o post-centrofoliculares, es posible que algunos se originen de linfocitos de memoria.

Cuadro N° 2. Características inmunohistoquímicas de linfomas de células pequeñas B en tejido fijado					
Diagnóstico	CD43	CD5	CD10	CD23	Bcl-1
Linfoma de células pequeñas B	> 90%	70-80%	-	>90%	-
Linfoma de célula del manto	> 90%	70-80%	5-10%	5-10%	>90%
Linfoma B de la zona marginal	20-30%	-	-	10-20%	-
Linfoma folicular	5-10%	-	>90%	-	-

En análisis moleculares, se logra demostrar un rearrreglo clonal de la cadena pesada y liviana de la Ig, lo que confirma que se trata de un linfocito B. En análisis citogenéticos, el 30-40% de los casos presenta trisomía 12. También se pueden detectar anomalías en el 13q o, en forma ocasional, la translocación t(14;19)(q32;q13), que hace que se sobreexpresen el producto del oncogén *Bcl-3*. Hay sobreexpresión del *BCL2*, pero no como resultado de la translocación t(14;18), como ocurre en los linfomas foliculares.

Linfoma linfoplasmocítico

El linfoma linfoplasmocítico es un tipo de LNH poco frecuente, en el que hay una mezcla de linfocitos pequeños con linfocitos plasmocitoides y células plasmáticas. Es un diagnóstico de exclusión, ya que el linfoma de células pequeñas, el linfoma de la zona marginal y el linfoma folicular, y aun el linfoma de la célula del manto, pueden tener diferenciación plasmocítica. La edad de presentación de este es similar a la del linfoma de células pequeñas, de adultos mayores; asimismo, suelen presentarse con linfadenopatías generalizadas, con o sin esplenomegalia, y falla progresiva de la médula ósea. A diferencia del linfoma de células pequeñas, frecuentemente compromete sitios extraganglionares y puede haber linfocitosis, aunque esto no es tan común. Muchos pacientes tienen un pico monoclonal de IgM (macroglobulinemia de Waldenström), que puede llevar a síndrome de hiperviscosidad.

Los linfocitos tumorales pueden tener dos tipos de inclusiones compuestas de acúmulos de Ig: nucleares (cuerpos de Dutcher) o citoplasmáticas (cuerpos de Russell). Ambas son PAS positivas. Ninguna de las dos inclusiones es exclusiva de neoplasia, pero la de Dutcher es más característica. Puede presentar histiocitos epitelioides, aislados o en acúmulos, y células cebadas.

Inmunohistoquímicamente, expresan marcadores pan B (CD20, CD19, CD22) y no coexpresan los

marcadores pan T: ni CD5 ni CD3. Tampoco expresa CD10 ni CD23. El 60% expresa CD43. A diferencia de las otras discrasias de células plasmáticas, expresa IgM y no IgG, o IgA. En ocasiones expresa IgD. Puede expresar CD38, un marcador de células plasmáticas. También son negativos para ciclina D1, lo que ayuda a diferenciarlo de algunas neoplasias de células plasmáticas.

Análisis moleculares revelan rearrreglo monoclonal de los genes de la Ig. El 50% presenta la translocación t(9;14)(p13;p32), que causa sobreexpresión del gen de un factor de transcripción de linfocitos B, denominado *PAX-5*.

Al igual que los linfomas de células pequeñas, es tratado con esquemas de baja agresividad; tiene un 59% de sobrevida a cinco años; y un 10% puede sufrir una transformación a un linfoma difuso de células B grandes, de curso ominoso. Se ha asociado a infección por hepatitis C, sin que el rol de esta se encuentre bien esclarecido.

Linfoma de células del manto (LCM)

Es un linfoma mucho más agresivo que los anteriores, con una sobrevida media de 3-5 años y una sobrevida del 27% a cinco años. La edad media de presentación es de 63 años y predomina en hombres.

El linfocito proliferante es del mismo tamaño o levemente más grande que un linfocito pequeño maduro. La proliferación neoplásica es de morfología monótona dentro de un mismo caso, pero de cierta variabilidad en diferentes casos (Figura N° 3). El linfocito puede ser de núcleo redondo, como los linfocitos pequeños, o irregular, semejante a los centrocitos (células centrofoliculares pequeñas hendidas). No hay centros de proliferación ni paraimunoblastos ni células centrofoliculares grandes no hendidas (centroblastos). Se acompaña de histiocitos epitelioides y de vasos hialinizados. Puede tener varios patrones de crecimiento:

- 1) Nodular, por localización en la zona del manto, la cual se ensancha progresivamente hasta ahogar el centro germinal.
- 2) Marginal.
- 3) Difuso.

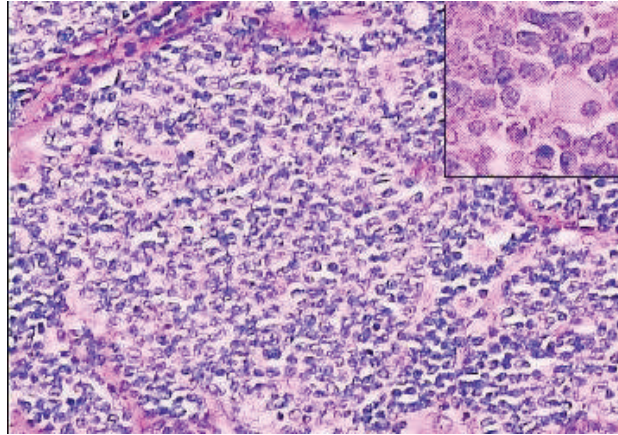


Figura N° 3. H&E, 20 x. Linfoma de célula de manto. Patrón de crecimiento vagamente nodular, pero no centrofolicular. Las células son pequeñas, de núcleo irregular, semejantes a centrocitos, con ocasionales histiocitos epitelioides, rosados (recuadro, 40x).

El LCM tiene variantes citológicas:

- 1) Marginal (monocitoides B): con amplio citoplasma claro.
- 2) De linfocito pequeño: importante de distinguir del linfoma de linfocitos pequeños de curso indolente.
- 3) Pleomórfico: de célula grande, con núcleo vesiculoso y abundantes mitosis.
- 4) Blástico: de célula semejante al linfoma linfoblástico, con cromatina dispersa y nucléolo inconspicuo; suele tener mayor cantidad de mitosis.

Inmunohistoquímicamente expresan IgM de superficie, por lo general IgD, más I que k (80% de los casos, a diferencia de los otros tipos de LNH, en que predomina k). Expresan los marcadores pan B (CD20, 19, 22, 79a) y CD23, así como los marcadores pan T CD 5 y CD43. No expresan ni CD10 ni CD11c.

Genéticamente se demuestra una translocación t(11;14)(q13;q32) en más del 95% de los casos, la cual hace que se sobreexpresen un gen denominado PRAD1 o *BCL-1*, con la sobreproducción de la ciclina D1, una proteína que controla el ciclo celular y que no suele expresarse en linfocitos normales. Esta regula el paso de G1 a S en el ciclo celular, lo que favorece la propagación de la célula en esta etapa. Además, los linfocitos del LCM tienen anomalías adicionales del control del ciclo celular, como inactivación de los genes supresores de tumores p53 y retinoblastoma. Estos actúan normalmente como freno del ciclo celular, por lo que su pérdida y mutación favorecen la

replicación no regulada del linfocito tumoral.

En los últimos años se han descrito casos de LCM que no expresan BCL-1 ni tienen la translocación t(11;14)(q13;q32), pero que aún muestran el patrón genético en microarreglo característico de este linfoma. Incluso, algunos casos son CD5-, CD43- y débilmente positivos para CD23. Si se analizan inmunohistoquímicamente con anti-ciclina D2 o anti-ciclina D3, tienen sobreexpresión de alguna de las dos en casi todos los casos, lo que explicaría el mecanismo etiopatogénico en estos. Los casos con ciclina D3 positiva no tienen sobreexpresión de ciclina D1 o D2 y viceversa; en otras palabras, son excluyentes entre sí. Los casos de pacientes negativos para ciclina D1 tienen características clínicas (edad, sexo, estadio, presencia de síntomas B, niveles de DHL, compromiso de sitios extranodales del Índice Pronóstico Internacional) y de supervivencia similares a los casos positivos para esta. La sobreexpresión de ciclina D2 también se encuentra en la mayoría de los linfomas de células pequeñas y en los linfomas linfoplasmacíticos. La sobreexpresión de ciclina D3 es más frecuente en otros tipos de linfomas B, como linfoma folicular, linfoma de la zona marginal o linfoma difuso de células grandes B. Se desconoce el mecanismo de sobreexpresión de las ciclinas D2 y D3, ya que no se ha detectado una translocación cromosómica o amplificación genética asociada. Algunos autores sugieren que la disregulación de estos puede ser un fenómeno epigenético.

Por otra parte, se ha demostrado sobreexpresión de SOX11, un factor de transcripción expresado en tejido

neuronal durante el desarrollo fetal, aun en los casos que son negativos para ciclina D1. La falta de expresión nuclear de SOX11 se ha identificado en un subgrupo de LCM de curso indolente. En perfiles de expresión genética, se ha demostrado positividad para SOX11 hasta en un 87% de los casos de LCM. Adicionalmente, no se ha reportado tinción inmunohistoquímica nuclear en tejido linfoide normal y solo se ha visto en ciertos otros linfomas (leucemia T prolinfocítica y linfoma Burkitt) de manera consistente.

La transformación blástica y/o la fase leucémica le confieren peor pronóstico. No presenta transformación a linfoma de células grandes. Se han descrito pocos casos con diferenciación hacia células plasmáticas.

El tratamiento quimioterapéutico tradicional no modifica en gran medida la baja sobrevida de estos linfomas. En un futuro tal vez se tratarán con inhibidores del ciclo celular.

Linfoma folicular (LF)

Este es un linfoma de grado bajo o intermedio, que tiene un patrón folicular en todo o parte del tejido comprometido, y se origina de los linfocitos B del centro germinal del folículo linfoide. En el centro germinal, las células sufren un cambio en morfología: de tamaño, de forma nuclear y de cromatina. Se caracteriza por una mezcla de centrocitos y centroblastos. La secuencia aceptada se ilustra en la Figura N° 4.

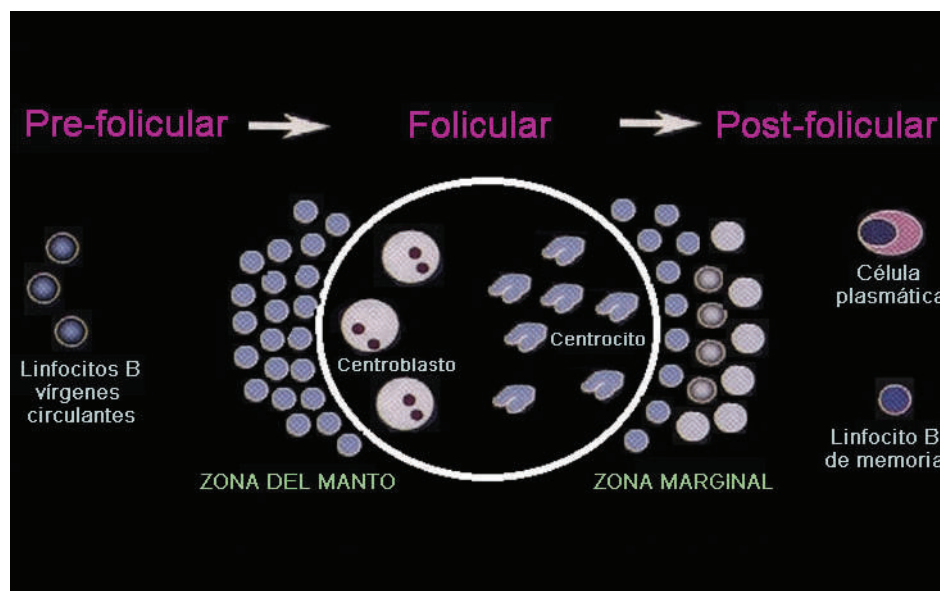


Figura N° 4. Esquema de la transformación del linfocito B maduro en el folículo linfoide y después de este. El linfocito B virgen circula en sangre y se congglomera en la zona del manto. Una vez retado por el antígeno, el linfocito se transforma en centroblastos y centrocito. Al salir del centro germinal, se acumula en la zona del manto, circula como linfocito B de memoria o se transforma a célula plasmática, produciendo gran cantidad de inmunoglobulina.

La división en grados se efectúa por el sistema de Berard de conteo de células grandes no hendidas (centroblastos): grado 1: 0-5 centroblastos; grado 2: 6-15 centroblastos; grado 3: > 15 centroblastos, valorando 20 campos microscópicos de alto poder, sin escoger los de mayor cantidad de células grandes. En la clasificación de la OMS, se señala que la separación relevante es la distinción de los grados 1 y 2 del grado 3, que presenta recaídas más cortas (sobrevida libre de enfermedad menor) y puede beneficiarse de esquemas terapéuticos con adriamicina, aunque no necesariamente en el tratamiento inicial.

Otra distinción importante es el reporte de extensión de las zonas difusas, ya que estas tienen repercusión en el pronóstico. Además, en el grado 3 (predominio de centroblastos) ameritan terapia más agresiva. Considerando que su significado clínico es controversial y que se deben tabular los datos para futuros estudios, se establece la siguiente división para el grado 1 y 2: predominantemente folicular (> 75% folicular), folicular y difuso (25-75% folicular) y predominantemente difuso (< 25% folicular). Sin embargo, en el grado 3, las áreas difusas se reportan por separado como linfoma difuso de células grandes. Así, por ejemplo, un caso que en la clasificación previa se determinaba como

un "linfoma folicular, grado 3, folicular y difuso", en la actualidad debe diagnosticarse como "linfoma folicular, grado 3/3, con linfoma difuso de células B grandes (25%)". La presencia de linfoma difuso de células B grandes (LDCBG) en cualquiera de los grados de linfoma folicular requiere de terapia más agresiva.

Existe una categoría muy rara de linfoma originado de células centrofoliculares, que no evidencia patrón folicular, sino difuso (linfoma centrofolicular difuso), demostrado por falta de una red dendrítica folicular (ausencia de expresión de CD21 o CD23). En la población presenta una mezcla de centrocitos (células pequeñas hendidas) y centroblastos (células grandes no hendidas). Los estudios indican que este tipo de linfomas tiene peor pronóstico que los casos con patrón folicular.

Cabe destacar que siempre se debe seguir diagnosticando como linfoma difuso de células grandes a aquel linfoma con más de 15 células grandes no hendidas por campo de alto poder.

Inmunohistoquímicamente, los linfocitos centrofoliculares neoplásicos expresan Ig en la superficie, los marcadores pan B (CD19, 20, 22, 79 a) y CD10 (CALLA) en el 59% de los casos, y *BCL-6* en el 60% de los casos. Raramente, expresan CD5 o CD43, los marcadores pan T coexpresados en forma aberrante en otros linfomas de células pequeñas. Hay sobreexpresión del *BCL2* en el 90% de los casos, con la excepción del linfoma folicular con predominio de células grandes, donde es positivo en el 74% de los casos. La sobreexpresión de *BCL2* es útil para distinguir los folículos neoplásicos de los folículos hiperplásicos, en los que no hay sobreexpresión, pero no para diferenciar entre el linfoma folicular y los otros linfomas de linfocitos pequeños, los cuales también pueden sobreexpresarlo.

La translocación t(14;18)(q32;q21) se encuentra en el 70-95% de los casos del linfoma folicular. Esto ocasiona la trasposición del *BCL-2* a una región influenciada por el promotor de la cadena pesada de la Ig, con la consecuente sobreexpresión, lo que le permite al linfocito mutado evadir la muerte celular programada. Por lo tanto, dicho linfocito y su progenie tendrán una vida prolongada, lo cual los expone a otras mutaciones, como sobreexpresión de *c-myc*, o anormalidades del 1p21-22, 6q23-26 o 17p. Además, también presenta mutación y sobreexpresión del p53, sobre todo en los LF grado 3.

El *BCL-6* también es un oncogén que se puede encontrar en LF, generalmente, en exclusión de la alteración del *BCL-2*. Es un protooncogen localizado en el cromosoma 3q27, que codifica una fosfoproteína nuclear

de 95-kD, con homología con factores transcripcionales, con rol fisiológico de represor transcripcional. Es una proteína necesaria para la formación de centros germinales y el montaje de la respuesta inmune mediada por linfocitos T. Se expresa normalmente en el núcleo de los linfocitos de los centros germinales y en linfomas foliculares o de linfomas originados de linfocitos B que han salido del centro germinal. Su detección por inmunohistoquímica no siempre correlaciona con rearreglo del gen. Por ejemplo, hay expresión del *BCL-6* en la mayoría de los linfomas foliculares, pero solo se encuentra rearreglo del gen en el 10-20% de estos. Esa aparente disociación entre la expresión del *BCL-6* y la translocación puede explicarse de tres maneras:

- 1) Presencia de rearreglo del gen no detectado por los métodos estudiados o presencia de otro tipo de aberración genética.
- 2) Expresión fisiológica debido al origen del linfoma en células derivadas del centro germinal
- 3) Los anticuerpos contra el *BCL-6* no son específicos.

Por otro lado, alrededor del 33% de los casos que sí tienen el rearreglo del gen, no tienen expresión del *BCL-6* por el método de inmunohistoquímica.

Epidemiología

El linfoma folicular es uno de los linfomas más frecuentes. En Estados Unidos representa el 40% de los casos; sin embargo, en Europa y Asia representa solo el 20% o 10%, respectivamente. En un hospital general (Hospital México) de San José, Costa Rica, ocupa el segundo lugar en incidencia, después del LDCBG, pero representa solo el 15% de los LNH, cifra más parecida a la reportada en Europa que a la reportada en los Estados Unidos.

La edad media de presentación es de 55 años; es muy raro en la infancia. Dos tercios de los casos se encuentran en estadio IV, por compromiso de médula ósea. Tiene un curso relativamente lento, pero progresivo, sin que este se logre modificar con los esquemas actuales de tratamiento. El 30-40% de los casos eventualmente presentará una transformación a linfoma difuso de células grandes, con curso más agresivo.

Linfoma de la zona marginal (LZM)

El linfoma de la zona marginal es una neoplasia de bajo grado, compuesta por linfocitos B semejantes a los que pueblan las zonas marginales externas a la zona del manto del folículo. Esta zona marginal es particularmente prominente en el bazo. Se postula que esta subpoblación linfoide es capaz de diferenciarse

hacia las células monocitoides B o hacia las células plasmáticas.

Se subdivide en tres categorías separadas en la clasificación de la OMS:

- γ LYM extranodal del tejido linfoide asociado a mucosas (MALT), extranodal, tipo MALT.
- γ LYM nodal.
- γ LYM esplénico.

Estos tres tipos de linfoma se consideran una misma entidad, que se presenta en sitios diferentes: extraganglionares, ganglionares o esplénicos.

- Linfoma de la zona marginal extranodal de tipo MALToma

Es un linfoma originado en el tejido linfoide “adquirido” por alguna infección o condición autoinmune que ocasione inflamación crónica, por lo que se presenta en órganos o tejidos que normalmente no tienen tejido linfoide. En la mayoría de los casos, se asocian a algún tipo de epitelio, de ahí la designación de tejido linfoide asociado a mucosas, mejor conocido como MALT, por sus siglas en inglés (*mucosa-associated lymphoid tissue*). No obstante, también puede presentarse en sitios no asociados a epitelios.

En las siguientes localizaciones se ha descrito en asociación con agentes infecciosos o procesos autoinmunes que desencadenan inflamación crónica:

- Tracto gastrointestinal, sobre todo en estómago, asociado a infección por *Helicobacter pylori* o a enfermedad inmunoproliferativa primaria del intestino delgado (IPSID) asociado a *Campylobacter jejuni*.
- Glándula salival y/o lacrimal: en pacientes con síndrome de Sjögren y/o hepatitis C.
- Pulmón: asociado a hepatitis C.
- Tiroides: en pacientes con tiroiditis de Hashimoto.
- Conjuntiva y anexos oculares: asociado a *Chlamydia psittaci* (no a *C. trachomatis* o *pneumoniae*).
- Piel: asociado a la espiroqueta *Borrelia burgdorferi*.
- Timo.
- Mama.
- Próstata.
- Vejiga.
- Riñón.
- Tejidos blandos: en estos casos, cuando el tejido linfoide no se asocia a epitelio, se designa como “linfoma de la zona marginal extranodal”.

Es un linfoma de reconocimiento reciente, inicialmente estudiado por el patólogo inglés Peter Isaacson y sus colaboradores en tracto gastrointestinal. Antes, casos de este tipo de linfoma se diagnosticaban como pseudolinfomas o linfomas de bajo grado, como linfoma de células pequeñas, linfoma folicular predominante de células pequeñas hendidas o linfoma de la célula del manto. Su asociación con epitelio de mucosas se debe a la integrina $\alpha_4\beta_7$, cuyo ligando es la molécula de adhesión de la célula adherente de la mucosa (MAdCAM-1). Ambas están expresadas en mucosas intestinales y en zona marginal esplénica.

Este tipo de linfoma es de adultos, pero presenta un rango etario desde los 8-82 años. La vasta mayoría se diagnostica en estadios clínicos tempranos (I o II), con extensión inicial solo a ganglios regionales o a otro sitio extraganglionar. Las formas localizadas pueden ser curadas, en la mayoría de los casos, con tratamiento local o, en el caso del linfoma tipo MALToma de localización gástrica, con erradicación del *H. pylori*, que le sirve de estímulo antigénico, a través de los linfocitos T. Lo mismo se afirma para casos de linfomas MALT de anexos oculares o cutáneos, y el tratamiento contra infecciones por *Chlamydia psittaci* y *Borrelia burgdorferi*, respectivamente; aunque la asociación con infección en estos casos no se encuentra tan bien establecido como en el estómago. Esto contrasta con los linfomas foliculares, que por lo general no están localizados al momento del diagnóstico, aun en localización extraganglionar, y tienen una sobrevida prolongada, pero no son curables con ninguno de los esquemas terapéuticos vigentes.

Los linfomas tipo MALT asociados a epitelio comparten cuatro características histológicas:

- 1) Proliferación difusa de linfocitos pequeños, con morfología de linfocitos pequeños o de centrocitos, de inmunofenotipo B.
- 2) Lesión linfoepitelial: invasión focal o extensa de los linfocitos neoplásicos B en el epitelio, con disrupción de este.
- 3) Hiperplasia reactiva de folículos linfoides adyacentes.
- 4) Diferenciación plasmocítica en localización subepitelial, con monoclonalidad en un 40% de los casos.

No todas las características deben estar presentes en cada caso. En algunos, los centrocitos pueden “colonizar” los folículos reactivos. En esta situación, es importante hacer el diagnóstico diferencial con un linfoma folicular.

Anteriormente, cuando el linfoma tipo MALT presentaba áreas de linfoma de células grandes o todo el linfoma era de células grandes, pero estaba localizado en un órgano en que se originan los linfomas tipo MALT, se denominaba “linfoma MALT de alto grado”. Sin embargo, en la clasificación de la OMS se especifica que esto no debe hacerse. El fin es separar los linfomas MALT puros de linfocitos pequeños, que sí responderán a terapia local o a tratamiento médico. Los linfomas tipo MALT que presenten un componente de linfoma de células grandes o los linfomas de células grandes en localización en órganos con MALT, se deben diagnosticar por aparte como “linfoma difuso de células B grandes”, ya que tienen otras anormalidades citogenéticas y ameritan tratamiento más agresivo.

Al igual que los linfomas de células pequeñas y los linfomas foliculares, los linfomas tipo MALT pueden sufrir transformación a linfoma difuso de células grandes, generando un peor pronóstico. Casos con cúmulos de células grandes mayores a 20 células se comportan como linfomas de células grandes sin componente de bajo grado. Adicionalmente, casos con 5-10% de células grandes en grupos menores de 20 células ya tienen peor pronóstico. Por lo tanto, parece que el límite en el que un linfoma tipo MALT puede tener células grandes es el de 5%.

De Jong y colaboradores sugieren dividir los linfomas tipo MALT en cuatro grupos:

- Categoría A: MALT de bajo grado, clásico, con menos de 5% de células blásticas transformadas.
- Categoría B: 10-20% de blastos, en grupos de hasta 20 células.
- Categoría C: láminas de células transformadas, que dejan solo focos de MALT de bajo grado.
- Categoría D: solo linfoma de alto grado, sin componente de bajo grado, clasificable como linfoma difuso de células grandes, sin referencia a MALT.

Inmunohistoquímicamente, las células que proliferan en el LZM tipo MALT y que expresan los marcadores pan B (CD19, 20, 22, 79a) son CD5-, CD10- y CD23-, y pueden o no expresar CD43. No expresan BCL1.

En el 30-60% de los casos se detecta trisomía 3, sola o en asociación con otras alteraciones cromosómicas. Se presenta en varios sitios de linfoma tipo MALT, pero se asocia con mayor frecuencia a localización en intestino (75%), glándula salival (55%) y anexo ocular/órbita (38%). Otra aneuploidía encontrada es la trisomía 18. Juntas, la trisomía 3 y la 18, se presentan en 22-42% de los casos como alteración única, sin las translocaciones anotadas a continuación.

En los casos sin trisomía, se ha descrito la presencia de la translocación t(11;18) (q21;q21). Esta ocasiona un gen quimérico, entre el API2, cuyo producto es un inhibidor de la apoptosis, y el gen MALT1, con función de paracaspasa. La t(11;18)(q21;q21) es específica para el LZM tipo MALT, ya que no se encuentra en otros tipos de linfoma, incluyendo LZM nodal o esplénico. Se reporta en 38,5% de los casos de localización pulmonar, en 24% de los casos de localización gástrica, en 18,5% de los casos de conjuntiva y en 14% de los casos de órbita. En cambio, está ausente en casos de tiroides, glándula salival, piel, hígado e IPSID.

La gastritis crónica asociada a *Helicobacter pylori* es la base de muchos casos de linfomas gástricos. Las cepas de esta bacteria, que son Cag-A positivas, son más virulentas y patogénicas, y se asocian también a mayor riesgo de carcinoma gástrico y úlcera péptica. Se ha demostrado que los linfomas gástricos de la zona marginal tipo MALT que tienen la t(11;18)(q21;q21) muestran una fuerte asociación con las cepas Cag-A positivas de *H. Pylori* (93%), en comparación con los casos sin dicha translocación (52%). Las cepas Cag-A positivas despiertan respuestas inflamatorias fuertes, por la inducción de interleuquina 8, una potente quimocina con acción activadora de neutrófilos. Los neutrófilos activados liberan factores oxígeno-reactivos, que causan una amplia gama de daño al ADN, incluyendo ruptura de la doble cadena. Esa podría ser la forma en la que promueve la translocación t(11;18)(q21;q21), que no parece estar asociada a los fenómenos de recombinación cromosómica de las cadenas de la Ig. Este mecanismo de lesión por neutrófilos activados podría también explicar la mayor asociación de dicha translocación en los casos de LZM tipo MALT bronquial, que se asocia a bronquitis folicular con inflamación aguda sobreagregada en 50% de los casos.

La presencia de la t(11;18)(q21;q21) correlaciona con tres datos de interés clínico:

- 1) Falta de respuesta a la terapia de erradicación del *H. Pylori*.
- 2) Estadío clínico más avanzado.
- 3) Ausencia de transformación a linfoma de células grandes.

Con menor frecuencia, se ha encontrado la translocación t(1;14)(p22;q32), la cual ha demostrado ser exclusiva para linfomas de tipo MALT gástrico o pulmonar. El gen involucrado es el *BCL-10*, que normalmente actúa como un gen supresor de tumores por regulación de la apoptosis, mientras que truncado actúa como oncogén. La proteína *BCL-10* se expresa normalmente en localización citoplasmática, en células

del centro germinal y de la zona marginal, pero solo débilmente en la zona del manto. En la t(1;14) el gen truncado de la proteína *BCL-10* es sobreexpresado por influencia del promotor de la cadena pesada de la Ig. La expresión en localización **nuclear** del *BCL-10* se ha encontrado en linfomas tipo MALT con t(1;14), aunque también se halla en algunos casos de este en ausencia de dicha translocación, con intensidad menor. Esta translocación se encuentra presente en el 5% de los casos y parece correlacionar con curso clínico más agresivo.

Otra translocación presente en un 20% de los casos de LYM tipo MALT es la t(14;18)(q32;q21); de manera más común en casos no gástricos ni pulmonares (piel, glándula salival, ocular). No compromete el *BCL-2*, sino el *MALT1*, que se localiza a 5 Mb centroméricas de este, y al promotor de la cadena pesada de la Ig.

Estas tres translocaciones tan diversas tienen en común que afectan un mismo mecanismo de transducción, lo que resulta en la **activación constitutiva de la vía del NF-kappaB**, que regula la proliferación celular, la apoptosis y la migración celular, lo que parece ser un mecanismo crítico en el crecimiento independiente de estímulo antigénico y en la progresión del linfoma. Lo interesante es que dicho mecanismo no solo parece jugar un rol muy importante en la patogenia de este tipo de linfoma, sino que también correlaciona con factores pronósticos (enfermedad diseminada) y predictivos (resistencia al tratamiento de erradicación de infección por *H. pylori*).

En el 2005 se reportó la presencia de una cuarta translocación: t(3;14)(p14;q32), donde nuevamente se encuentra involucrado el promotor de la cadena pesada de la Ig. El 3p14.1 codifica un factor de transcripción llamado *FOXP1*. La sobreexpresión de este tiene efecto oncogénico independiente de la vía del NF-kappaB. Esta translocación es mutuamente excluyente de las otras tres translocaciones y es más frecuente en LYM tipo MALT de tiroides, piel u oculares; en cambio, no se encuentra en casos gástricos, salivales o pulmonares.

El LYM tipo MALT es de curso indolente y puede permanecer localizado por periodos prolongados. Si hay compromiso sistémico, usualmente es debido a la presencia de múltiples focos simultáneos de lesión tumoral en otros sitios mucosos, por el fenómeno de anidación ya mencionado. Se reporta compromiso de médula ósea en un 10-15% de los pacientes.

La resistencia a tratamiento de erradicación del *Helicobacter pylori* en linfomas tipo MALT puede deberse a:

1. Lesión no superficial, con compromiso de capas profundas de la pared.
2. Presencia de t(11;18)(q21;q21).
3. Presencia de transformación a linfoma de células grandes (sin embargo, algunas veces estos responden a tratamiento de erradicación).

- LYM nodular

Al igual que el linfoma de la zona marginal extranodal tipo MALT, el LYM nodular tiene aspecto histológico heterogéneo, con centrocitos, células monocitoides B, linfocitos pequeños y células plasmáticas. Puede haber, además, ocasionales centroblastos y/o inmunoblastos, así como folículos linfoides reactivos, con la población neoplásica ocupando la zona marginal (por fuera de la zona del manto) y/o la zona interfolicular. Los linfocitos tumorales con aspecto de centrocitos o células monocitoides B pueden “colonizar” algunos folículos. Puede existir diferenciación plasmocítica.

La mayoría de estos linfomas ocurre en pacientes con síndrome de Sjögren o acompañando un linfoma de la zona marginal tipo MALT. En este último caso, probablemente corresponde a extensión del linfoma a ganglios regionales. Sin embargo, se dan casos en los que no hay compromiso de un sitio MALT, y casos de diseminación ganglionar sin compromiso de tejidos MALT. También, hay otros casos con compromiso de médula ósea y, aún más extraño, con compromiso de sangre periférica.

Inmunohistoquímicamente, es similar al de tipo MALT: es de curso indolente y puede presentar transformación a linfoma de células grandes.

- LYM esplénico

Este subtipo difiere de los otros dos en la localización y la característica vellosa de algunos de los linfocitos circulantes, cuando tiene fase leucémica. Posee un característico patrón de compromiso de la pulpa blanca, con infiltración de la zona marginal y del manto, usualmente con un centro germinal residual, que puede estar atrófico o hiperplásico. La morfología de los linfocitos varía desde los linfocitos pequeños de la zona del manto, hasta los linfocitos más grandes, con núcleo irregular y citoplasma claro de la zona marginal. Puede haber diferenciación plasmocítica y extensión a la pulpa roja, en patrón vagamente nodular o difuso. Existe una leucemia linfocítica crónica B del adulto, con linfocitos vellosos circulantes, que con frecuencia se confunde con leucemia de células pilosas, y que tiene las mismas características de este linfoma. Por lo tanto, se cree que este linfoma corresponde a la contraparte tisular de dicha leucemia.

El inmunofenotipo es similar al descrito en los otros dos subtipos.

Genéticamente, no se ha detectado trisomía 3, como en el tipo MALT extranodular.

Se ha sugerido una asociación del LZM esplénico con infección crónica por el virus de la hepatitis C, con respuesta a tratamiento antiviral (interferon alpha y ribavirina) en varios casos.

Los pacientes portadores de este linfoma son adultos mayores. Típicamente, tienen compromiso de médula ósea y sangre periférica, sin linfadenopatías periféricas. Pueden tener un pequeño pico monoclonal M en cerca de un tercio de los casos. El curso es indolente, con alrededor de un 70% de sobrevida a cinco años. La esplenectomía puede ir seguida de remisión prolongada de la enfermedad.

Linfoma difuso de células B grandes (LDCBG)

Representan el 35% de los casos en Estados Unidos. En Costa Rica es el linfoma más frecuente, representando el 38% de los casos en un hospital general en el período 2011-2013, seguido muy por detrás por el linfoma folicular (17%).

Son más frecuentes en adultos, con una edad media de presentación de 55 años, aunque pueden presentarse a cualquier edad. De hecho, en edad pediátrica representa el 25-33% de los casos. En la mayoría de los pacientes se presentan en estadios clínicos tempranos. Por lo general, tienen una lesión única, ganglionar o extraganglionar, de crecimiento rápido, más común en región cervical, axilar o mediastinal. Además, suele haber compromiso extraganglionar (40% de los casos), con mayor frecuencia en tracto gastrointestinal, piel y anillo de Waldeyer.

Este linfoma tiene crecimiento difuso y se encuentra compuesto por células grandes, por lo menos dos veces el tamaño de un linfocito pequeño y usualmente más grandes que el núcleo de un histiocito. Tienen citoplasma claro a basofílico, núcleo vesiculoso y nucléolo prominente. El núcleo puede ser redondo, levemente irregular o polilobulado (Figura N° 5). La mayor parte de los casos tienen morfología de centroblastos (células centrofoliculares grandes no hendidas) o inmunoblastos; en menor cantidad se presentan casos donde la morfología es de células centrofoliculares grandes hendidas, de células multilobuladas o de células grandes anaplásicas, idénticas a las del linfoma anaplásico de células grandes CD30+, excepto que expresan inmunofenotipo B, en vez de T o nulo. Algunos casos

pueden tener predominio de linfocitos pequeños T con o sin histiocitos (linfoma difuso de células grandes B, rico en linfocitos T e histiocitos) (Figura N° 6), creando una imagen semejante a la de linfomas T periféricos o enfermedad de Hodgkin. Sin embargo, en estos casos es importante la demostración del inmunofenotipo B de las células grandes, que son las tumorales.

Inmunohistoquímicamente, expresan los marcadores pan B (CD19, CD20, CD22, CD79a). Alrededor del 5% de los casos puede expresar CD5, un marcador de célula T. Otro subgrupo de alrededor de un 20% puede presentar coexpresión aberrante del marcador pan T CD43. El CD10 es expresado en el 25% de los casos. El *BCL-2* se expresa en el 72% de los casos, pero solo hay rearrreglo genético en el 10-25% de estos, lo que se correlaciona con origen en células centrofoliculares. El *BCL-6* se expresa inmunohistoquímicamente en el 50% de los casos, pero no siempre correlaciona con rearrreglo genético, como ya se mencionó en la discusión de linfomas foliculares. Se localiza en el cromosoma 3q27 y es del grupo de translocaciones "promiscuas", ya que puede presentar translocación con diferentes cromosomas, como los genes de la cadena pesada (cr 14) o livianas (cr 2 o 22), cr 4 y otros. Las translocaciones del gen *BCL-6* son más frecuentes en los casos *de novo*, que en los de transformación de linfomas foliculares u otros linfomas de bajo grado. En algunas casuísticas pequeñas, la expresión de *BCL-6* por inmunohistoquímica correlaciona con mejor pronóstico. El mecanismo de acción de la sobreexpresión de *BCL-6* como favorecedora de linfomagénesis se debe tal vez a que bloquea la expresión de p53 y, por ende, la apoptosis inducida por daño al ADN.

Debido a que los linfomas difusos de células grandes B son heterogéneos en características clínicas, citomorfológicas, inmunohistoquímicas y pronósticas, los estudios de su perfil de expresión genética, basada en más de 17 mil genes, ha revelado tres subgrupos principales distintos:

- 1) LDCBG-CGB: probablemente derivado de célula B del centro germinal, con sobrevida del 59% a cinco años.
- 2) LDCBG-CBA: de célula B activada, derivado tal vez de una célula B post-centrogerminal, en vías de diferenciación hacia célula plasmática, con sobrevida del 30% a cinco años.
- 3) LDCBG-PM: primario del mediastino, probablemente derivado de una células B tímica, con sobrevida del 64% a cinco años.

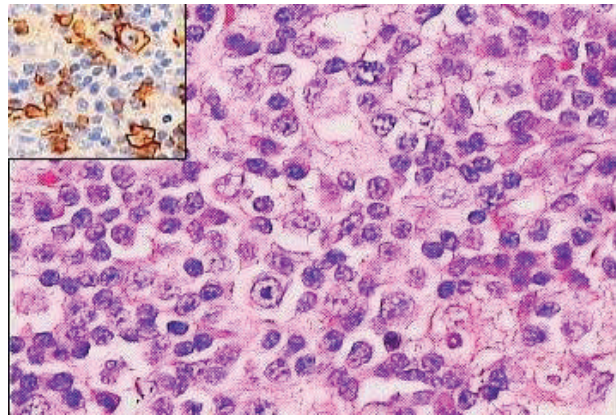


Figura N° 6. H&E, 40x. Linfoma de células B, rico en células T e histiocitos. Entre una población de linfocitos pequeños se observan las células linfoides grandes, tumorales, con abundante citoplasma claro y núcleo vesiculoso. Con inmunohistoquímica se evidencia que las células grandes tumorales son de inmunofenotipo B, CD20+, expresado en la membrana (recuadro, 20x).

Los linfocitos pequeños expresan CD3 (no mostrado).

Debido a que en muy pocos laboratorios a nivel mundial es posible efectuar análisis del perfil genético, en este tipo de linfomas se simplificó dicho perfil. Lossos y colaboradores, de la Universidad de Stanford, lograron determinar un grupo de seis genes, que con análisis univariable, son fuertes predictores de sobrevida. Estos son: el LMO2 y el BCL6, que pertenecen al perfil de células centrogerminales; el BCL2, el CCND2 y el SCYA3, que a su vez se asocian al perfil de célula B activada; y el FN1, que pertenece al perfil de localización en ganglio linfático. El perfil de estos seis genes fue independiente del Índice Pronóstico Internacional (IPI), pero le añadió valor predictivo a este.

El IPI reúne los siguientes parámetros pronósticos: edad, "performance status" o estado general según el *Eastern Cooperative Oncology Group* (ECOG), estadio clínico, nivel de DHL y número de sitios extranodales. Así, en un conjunto de pacientes cuyo IPI era de bajo riesgo de muerte, este modelo de seis genes identificó un subgrupo que tuvo una sobrevida de 57% a cinco años.

Los análisis del perfil genético han determinado que los LDCBG-CGB se caracterizan por frecuente amplificación de REL y translocación del *BCL-2*, lo cual no se presenta en el grupo LDCBG-CBA. Además, el LDCBG-CBA y el PM tienen activación constitutiva de la vía NF-κB, que requieren para su sobrevida.

Como no es posible hacer estudios de perfiles genéticos en la mayoría de los casos, se ha enfocado en las proteínas que regulan la apoptosis, junto con el IPI, para evaluar el riesgo de falla al tratamiento convencional. Una de estas, y tal vez la más conocida,

es el *BCL-2*, que regula la muerte celular programada. Esta regulación se da por diversos mecanismos: por acción antioxidante, por bloqueo de la actividad de las caspasas y por regulación del flujo del Ca^{++} . A pesar de que tanto el LDCBG-CGB como el CBA pueden sobreexpresar *BCL-2*, en el primer grupo esto se debe a la translocación t(14;18)(q32;q21) y a su actividad anti-apoptótica; mientras que en el grupo de célula B activada no se observa esta translocación, y la sobreexpresión podría deberse a varios mecanismos: 1) por amplificación del gen 18q21-q22, que se da en un 33% de los casos; 2) por la activación constitutiva de la vía NF-κB, uno de cuyos genes blanco es el *BCL-2*; y 3) por activación del MALT1, uno de los genes que está activado solo en el grupo de CBA y que codifica una paracaspasa, la cual, junto con el *BCL-10*, activa la vía NF-κB, que también favorece la sobreexpresión de *BCL-2*. Esta sobreexpresión se asocia con sobrevida baja solo en el grupo de CBA y no en el de CGB. En el grupo de CBA tiene correlación con niveles altos de DHL y estadios clínicos altos, ambos factores de mal pronóstico. Además, la sobreexpresión del *BCL-2* en este le confiere resistencia al tratamiento, lo cual puede resolverse agregando rituximab, que como la mayoría de los anticuerpos monoclonales terapéuticos, actúa estimulando la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo y la citotoxicidad dependiente de complemento. Además, inhibe la proliferación celular e induce la apoptosis. Adicionalmente, el rituximab inhibe la expresión de IL-10, la cual es promotora de la expresión de *BCL-2*.

Los linfomas difusos de células B grandes son agresivos y pueden llevar a la muerte en pocos meses. Sin embargo, a diferencia de los linfomas de bajo grado, son curables hasta en un 60% de los casos con

los esquemas terapéuticos actuales. Un 30% de los casos de LDCBG puede ser refractario a quimioterapia.

Se presentan algunas variantes de esta entidad que se clasifican como LDCBG primario de mediastino, intravascular y primario de efusión.

- Linfoma difuso de células B grandes primario del mediastino

Constituye el 2,4% de todos los LNH. La edad de presentación es entre los 20-50 años, con una media en la tercera o cuarta década de la vida, y predomina en mujeres. Se manifiesta como masa mediastinal anterior, frecuentemente mayor a 10 cm de diámetro, que comprime vías aéreas superiores y produce el síndrome de vena cava superior; menos del 50% tiene síntomas constitutivos B. Puede infiltrar fosa supraclavicular (ganglio o tejidos blandos), tejidos de la pared torácica, incluyendo el esternón, pleuras, pulmón e incluso, lumen bronquial, produciendo masa endobronquial. Tiende a presentar recaídas en tejidos extraganglionares, como hígado, tracto gastrointestinal, riñones, corteza adrenal, páncreas, ovarios y sistema nervioso central. El compromiso de médula ósea se presenta en menos del 5% de los casos.

Es un linfoma de células grandes con características nucleares variables: de centroblastos, centrocitos grandes, multilobulados o inmunoblásticos. Con frecuencia, el citoplasma es claro. Pueden haber células semejantes a células de Reed-Sternberg. Muchos casos tienen una esclerosis fina, que rodea células y/o divide al tumor en nódulos, pero esta también puede ser de bandas gruesas. Hay cantidad variable de linfocitos pequeños e histiocitos y, en forma ocasional, de neutrófilos, pero no se encuentran células plasmáticas ni eosinófilos. Usualmente, compromete el timo, lo cual puede ser demostrado por la presencia de remanentes tímicos citoqueratina +. Expresa marcadores pan B (CD20, CD79a), CD23, BCL-6, Oct2 y Bob1; puede expresar de forma débil el marcador de activación linfoide CD30, pero a diferencia del LH, no expresa CD15 y expresa CD45. Por lo general, es CD10 negativo e Ig de superficie negativo. No expresa CD5 ni CD21. Algunos casos son BCL-2+. El Epstein-Barr virus (EBV) es negativo. En la mayoría de los casos, hay expresión de MAL, una proteína involucrada en transducción de señales, que no está presente en los otros tipos de LNH de células grandes.

El CD23 se encuentra expresado fuertemente en una subpoblación normal de células grandes, dendríticas CD20+ (células asteroideas), que se identifican entre

los linfocitos B tímicos. Se cree que esta población podría ser la contraparte normal del linfoma de células B grandes (LCBG) primario del mediastino, que expresa CD23 en el 70% de los casos; mientras que los linfomas de células grandes (LCG) ganglionares o extranodales no mediastinales, solo lo expresan en el 15% y 9% de los casos, respectivamente.

Por lo general, las células linfoides del LCBG del mediastino no expresan Ig de superficie y raramente tienen Ig citoplasmática, a pesar de que sí expresan CD79a, el cual es coreceptor de la Ig de superficie. Tampoco expresan moléculas de HLA tipo I y II. A pesar de la ausencia de Ig de superficie, sí tienen rearreglo clonal de los genes de la cadena pesada y liviana de la Ig. Los genes de la Ig muestran hipermutaciones somáticas de la región variable y "switch" isotípico, pero no tienen "ongoing mutations".

En este tipo de linfomas la ganancia de material genético es más común que la pérdida. La mayoría de las ganancias son en regiones del cromosoma 2, 9p, 12q y Xq. La ganancia en el cr 9p se asocia a amplificación de JAK2 (Janus kinasa) y la ganancia en el 2p, con amplificación del c-REL (homólogo del oncogén de reticuloendoteliosis viral). El c-REL es un factor de transcripción de la familia de NFkappaB (nuclear factor kappa B). Es una subunidad del heterodímero NFkappaB. En su estado inactivo, se localiza en el citoplasma, unido al Ikb (inhibidor del NFkappaB). Al activarse, el cREL es liberado y se traslada al núcleo. Esto activa genes blanco, uno de los cuales es el TRAF1 (factor asociado al receptor de necrosis tumoral); este se localiza en el citoplasma. Se ha reportado cREL nuclear en el 65% de los casos de linfoma de células grandes B del mediastino y solo en el 18% de los otros tipos de linfoma difuso de células grandes. Además, la expresión combinada de c-REL nuclear y TRAF1 citoplasmático se reporta en el 53% de los casos de linfoma de células B grandes del mediastino, pero solo en el 2% de los otros tipos de linfomas difusos de células B grandes; es decir, muestra una especificidad de esta combinación del 98%. Lo mismo sucede con el LH clásico y otros tipos de LNH que no son el primario de mediastino. El LH clásico coexpresa c-REL nuclear y TRAF1 citoplasmático en el 80% de los casos; en cambio, los otros tipos de linfomas, como el anaplásico de células grandes CD30+, el LHPL nodular y otros tipos de LNH de células grandes que no son primarios del mediastino, solo los coexpresan en un 3% de los casos.

Otra activación constitutiva encontrada en LCBG primario del mediastino es en el STAT6 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 6*). Esta parece estar asociada a deleciones o mutaciones en el

gen del SOCS1 (*supressor of citokine signaling 1*), que es un regulador negativo de señalización de citocinas. El SOCS regula la proliferación celular, la supervivencia y la apoptosis, por la activación de la vía JAK/STAT.

Por características clínicas, histológicas e inmunohistoquímicas, puede confundirse con un linfoma Hodgkin clásico, con esclerosis nodular o con muchas células lacunares. La distinción de estas dos entidades es muy importante, ya que el tratamiento de ambas es muy diferente. El LDCBG mediastinal y el LHCEN comparten algunos de los mecanismos patogénicos iniciales y algunas características biomoleculares; por ejemplo, tienen activación constitutiva de la vía JAK/STAT y la del NfκB, y cuentan con una alta expresión de genes relacionados con IL4/IL-13Rα, interferón y la superfamilia TNF. Las IL4/IL-13Rα se asocian a expresión de JAK2, FIG1 y CD23. La superfamilia TNF/receptor de TNF se asocia a expresión de CD30, Fas/CD95 y TRAF1. Aunque ambos linfomas tienen activación constitutiva de STAT6 y mutaciones en el gen de SOCS, en el LHCEN la activación de STAT6 parece estar relacionada con secreción autocrina de IL-4/IL-13.

Existen algunos casos con características tumorales híbridas entre estos tipos de linfomas, lo cual se ha denominado "linfoma de células B no clasificable, con características intermedias entre LDCBG y LHC", y son muy problemáticos para el patólogo. En la actualidad, se cree que estos dos linfomas son parte de un *continuum*, con cada uno de ellos en los extremos.

- LDCBG Intravascular

Es un linfoma de células grandes, con llamativo crecimiento intravascular. Se le conoce como linfoma angiocéntrico o angioendoteliomatosis. Frecuentemente, compromete piel y sistema nervioso central. Los ganglios linfáticos pueden tener compromiso focal o difuso, pero en esa localización no muestra componente intravascular prominente. Debe diferenciarse de los de inmunofenotipo T.

- Linfoma primario de efusión

Es un linfoma de células grandes B que se presenta principalmente en cavidades corporales (pleural, pericárdica, peritoneal), en vez de formar masas tumorales sólidas. Por lo general, se presenta en pacientes VIH-positivos, aunque raramente puede presentarse (< 1%) en pacientes VIH-negativos, por lo general en ancianos. No expresa ni marcadores B ni T, pero análisis genotípicos muestran rearrreglo de Ig. El 100% de los casos tiene infección por el herpesvirus HHV-8 (virus del sarcoma de Kaposi).

También se encuentra el EBV. No presenta ninguna de las translocaciones encontradas en los otros linfomas, como rearrreglos del *BCL-1*, *BCL-2*, *BCL-6*, *c-myc* ni mutaciones del p53. Es un linfoma de comportamiento muy agresivo.

Linfoma Burkitt (LB)

Este es un linfoma de gran agresividad, originado de una de las etapas de un linfocito centrofolicular (la célula pequeña no hendida) o de un linfocito post-folicular.

El linfoma de Burkitt tiene las translocaciones características en las que la parte del cromosoma 8, con el oncogén *c-myc*, pasa a la influencia de los promotores de las cadenas pesadas o livianas de la Ig, en los cromosomas 14 (cadena pesada) (80% de los casos), 2 (cadena liviana k) o 22 (cadena liviana λ). Esta translocación del *c-myc* hace que el linfocito esté perpetuamente en el ciclo de división celular, lo cual le confiere un crecimiento muy rápido. No obstante, también hay mucha muerte celular; es decir, hay un alto recambio celular, lo que le da el aspecto histológico y el comportamiento biológico agresivo. El estándar de oro en el linfoma Burkitt es, pues, la presencia de una de estas translocaciones y la consecuente sobreexpresión del oncogén *c-myc*. Sin embargo, no siempre es posible efectuar análisis citogenéticos en linfomas. Tampoco es posible siempre determinar la sobreexpresión del *c-myc*. Por lo tanto, se considera linfoma Burkitt cuando hay una fracción de proliferación, determinada inmunohistoquímicamente por un anticuerpo marcador de esta, como el Ki-67, mayor del 97%.

En general, existen tres subcategorías del linfoma de Burkitt:

- a) **Endémico.** El Burkitt endémico se presenta en regiones ecuatoriales de África y Padua, y Nueva Guinea. Ocurre primariamente en niños, predomina en hombres (2-3:1), tiene alta correlación con el EBV (95% de los casos) y se presenta de manera más frecuente en huesos maxilares (90%) o en abdomen (50-60%).
- b) **No endémico o esporádico.** El Burkitt no endémico tiene un pico de incidencia etaria más tardío, en la segunda década se presenta con frecuencia en abdomen (90% de los casos), en ileon, ciego, mesenterio, ovarios, riñones o en mamas, y tiene mucho menor asociación con el EBV (5-15%). Sobre este tema, es interesante la observación del Dr. Magrath, de que tal vez haya factores de crecimiento asociados que determinan

los sitios de mayor incidencia del linfoma de Burkitt endémico y no endémico: factores de crecimiento de dientes, para la presentación en maxilares en niños, y factores de crecimiento de ovarios y mamas en niñas prepuberales.

- c) Asociado a inmunodeficiencia.** El linfoma Burkitt asociado a inmunodeficiencia adquirida por VIH demuestra la presencia del EBV solo en un 25-40% de los casos. En todas las categorías es raro el compromiso en mediastino, hígado o bazo. El compromiso de médula ósea ocurre en el 10-30% de los casos. Antiguamente había una división arbitraria con la leucemia linfoblástica aguda FAB L3.

Otras diferencias entre la forma endémica y la forma no endémica existen a nivel molecular del linfoma Burkitt:

- En la categoría endémica, el punto de quiebre del cromosoma 8 en la translocación es > 1.000 kilobases (kb) corriente arriba del gen *c-myc*; en cambio, en la categoría no endémica, el punto de quiebre es dentro del gen o muy cerca (< 3 kb) de este.
- En la categoría endémica, el punto de quiebre del cromosoma 14 es en la región de unión (J) de la cadena pesada de la Ig; mientras que en la categoría no endémica, el punto de quiebre es en la región de *switch* de la Ig, lo cual sugiere que es una etapa más tardía del desarrollo del linfocito B.

Desde el punto de vista histológico, casi siempre hay una desaparición extensa de la arquitectura, por una proliferación difusa, monótona de células de tamaño intermedio, con cromatina groseramente reticulada, dos a cinco nucléolos y citoplasma anfofílico, que puede moldearse con el citoplasma de células adyacentes. Hay un alto índice mitótico y un aspecto de "cielo estrellado", debido a múltiples macrófagos dispersos entre la población tumoral.

Inmunohistoquímicamente, los linfocitos expresan los marcadores pan B (CD19, 20, 22, 79a), no expresan CD5, CD23, BCL-2 ni TdT y expresan CALLA (CD10) y BCL-6. El Ki-67 es positivo en casi el 100% de la población.

Es un linfoma muy agresivo, pero potencialmente curable. En niños, el pronóstico depende del tamaño de la masa tumoral al momento diagnóstico. La distinción entre un linfoma Burkitt y un linfoma difuso de células B grandes de alto grado puede ser muy difícil, sino imposible, solo se logra con características morfológicas, inmunohistoquímicas e

incluso, citogenéticas. Existen un 5-10% de LDCBG con translocaciones del *c-myc*. Como el LDCBG es 20 veces más frecuente que el LB, es más probable que un linfoma de alto grado con translocaciones del *c-myc* sea un LDCBG. Sin embargo, esta distinción es de gran importancia para el paciente, ya que los casos de LB tienen pésimo curso clínico si son tratados con los esquemas estándar (CHOP). En cambio, si son tratados con esquemas intensivos, como el Berlin-Frankfurt-Munster y profilaxis al SNC tienen una cura del 90% en niños y del 70% en adultos. Con análisis de 2524 genes se logró determinar que estos dos tipos de linfomas difieren en genes blanco del *c-myc*. Además, aunque ambos tipos se originan de células centrofoliculares, los LB tienen expresión de un subgrupo de genes de la célula B centrogerminal. También se encontró que los genes blanco del FNkB y los genes MHC clase I se expresan a niveles más bajos en LB que en LDCBG. Este perfil permite discriminar aún más precisamente entre estas dos entidades. Además, demostró que hay un subgrupo de LDCBG que, por perfil genético, son del tipo LB y ameritan un tratamiento más agresivo. Este último grupo ahora entra dentro de la categoría de linfoma de células B no clasificable, con características intermedias entre LDCBG y LB.

Neoplasia de células plasmáticas

Son neoplasias de células plasmáticas maduras o inmaduras, sin mezcla con células de aspecto linfoide. Algunos casos pueden tener núcleos hendidos o morfología de inmunoblastos (plasmablastos).

La mayoría de los casos se presentan como tumores diseminados en la médula ósea de adultos mayores, con pico monoclonal de Ig, denominados mielomas múltiples. Con menor frecuencia, se presentan como tumores solitarios de hueso o de tejidos extramedulares (plasmocitoma). La mayoría de los plasmocitomas óseos progresan a mielomas múltiples, mientras que solo el 10-20% de los plasmocitomas extramedulares tendrán esa progresión. El plasmocitoma extramedular anaplásico tiene morfología de linfoma de células grandes inmunoblástico. La distinción debe hacerse con inmunohistoquímica.

Las células tumorales no expresan Ig en la superficie, sino en el citoplasma. La mayoría de los marcadores pan B no están expresados. Expresan CD38 y CD138. Pueden expresar EMA, CD30, CD56, CD43, CD 45 y HLA-DR. La ciclina D1 es positiva hasta en un 14% de estas neoplasias, y ayuda a diferenciarlas de los linfomas con diferenciación plasmacítica.

LINFOMAS DE LINFOCITOS T Y NK MADURAS

- Linfomas T periféricos

Los linfomas T periféricos (LTP) se originan de células T maduras, post-tímicas. En Occidente representan solo el 10-15% de los casos de LNH; en cambio, en Asia es frecuente. Se presenta en todas las edades, pero es más común en adultos mayores. El linfoma/leucemia T periférico del adulto se relaciona con infección por el HTLV-1. Una minoría de los casos se relaciona con infección por EBV, sobre todo los casos del tracto respiratorio superior, más específicamente, los nasales.

Es importante distinguir los linfomas T de los B, no solo para entender el curso clínico y la evolución, sino por la diferencia en sobrevida general a cinco años (25% para LTP versus 46% para el linfoma difuso de células B grandes) y sobrevida libre de enfermedad (18% para LTP versus 41% para LDCBG). En un futuro no muy lejano, el tratamiento de los linfomas B y T será dirigido específicamente a la célula de origen.

Se reconocen algunas entidades clínicopatológicas bien establecidas, que se pueden separar del grupo, incluyendo micosis fungoides, síndrome de Sézary, leucemia/linfoma T del adulto, linfoma T/NK extraganglionar, nasal y tipo nasal, linfoma T asociado a enteropatía, linfoma T angioinmunoblástico, linfoma T hepatoesplénico, linfoma T subcutáneo paniculítico, linfoma anaplásico de células T grandes, linfoma de célula T CD30+ primario cutáneo y linfoma semejante a hidroa vacciniiforme. Los linfomas de linfocitos T maduros que no corresponden a ninguna de estas categorías se colocan dentro de la entidad de linfomas T periféricos.

En el corte histológico nunca presentan patrón folicular; tienen crecimiento difuso, preferentemente parafofolicular o sinusoidal. Los LTP en general, tienen un espectro de tamaños celulares variado en el mismo tejido y en diferentes casos. El núcleo de los linfocitos tumorales con frecuencia es irregular. Es común que tengan citoplasma claro, pero esto puede verse también en algunos linfomas B. Ocasionalmente, puede haber células de Reed-Sternberg, pero en el LTP hay transición entre linfocitos pequeños, medianos y grandes, y no la dicotomía marcada que se observa en el LH, donde hay linfocitos pequeños regulares y las células tumorales muy grandes. También, como en LH, los LTP pueden tener infiltración por eosinófilos, células plasmáticas, linfocitos pequeños e histiocitos epitelioides o no epitelioides. Un subgrupo puede ser rico en histiocitos, con muy escasas células tumorales dispersas. Para este tipo de linfoma se han utilizado los

términos linfoma de Lennert o linfoma linfoepiteliode. Es común que el ganglio presente una vascularidad aumentada, con inusual prominencia de vénulas post-capilares de endotelio alto.

Por citometría de flujo se ha logrado demostrar pérdida de marcadores T expresados normalmente en el 50-75% de los LTP, lo que se cree implica monoclonalidad en una proliferación T. El inmunofenotipo aberrante más frecuente es la pérdida de expresión del CD3, seguida por la pérdida de expresión del CD7, del CD5 o del CD2. Sin embargo, el CD2 es el más estable. La citometría de flujo también es útil para demostrar el inmunofenotipo de células NK: CD16+/CD56+/CD57⁺.

Puesto que la mayoría de las muestras se reciben fijadas en formalina y, además, muchos hospitales no cuentan con la infraestructura para efectuar citometría de flujo, los casos deben estudiarse por inmunohistoquímica. A pesar de que aún hay anticuerpos que no detectan el antígeno fijado en formalina, cada vez se dispone de más marcadores para inmunohistoquímica. El panel debe incluir al menos tres marcadores pan T (CD3, CD43 y CD 45RO) y un marcador pan B, altamente específico y sensible como el CD20. El 95% de los casos de LTP se detectarán con estos tres marcadores pan T. El CD3 policlonal marcará también las células NK. El CD43 es mejor para detectar LTP que el CD45RO, pero se debe recordar que existen algunos subgrupos de linfomas B que lo coexpresan aberrantemente, por lo que es importante siempre valorar el CD20. Si un linfoma es CD20+/CD43+ se clasifica como linfoma de inmunofenotipo B. Si una neoplasia hematológica solo expresa CD43 se debe descartar que sea de origen mieloide (leucemia mieloblástica aguda). La mayoría de los LTP tiene fenotipo de células T ayudadoras CD4+/CD8-, aunque puede presentarse el inmunofenotipo T citotóxico/supresor CD4-/CD8+ o casos doble positivo (CD4+/CD8+) o doble negativo (CD4-/CD8-), estos dos últimos considerados aberrantes fuera del timo y, por ende, indicativos de neoplasia. Ocasionalmente, algún caso requerirá de estudios moleculares para la detección de rearreglo del gen del receptor de células T (TCR), con el fin de establecer el diagnóstico de LTP.

Hasta el momento, los linfomas T periféricos se tratan como los LDCBG.

Micosis fungoide y Síndrome de Sézary

El Síndrome de Sézary es la fase leucémica de la micosis fungoide y fue el primer linfoma T descrito. Se presenta en la piel y/o en sangre periférica, con o sin compromiso de ganglios. La médula ósea usualmente está libre de lesión.

Las células tumorales que predominan son pequeñas, con núcleo cerebriforme, con una minoría de células grandes, con núcleo igualmente irregular. Infiltran la dermis y epidermis, formando abscesos de Pautrier. El infiltrado se acompaña de células de Langerhans e histiocitos interdigitales dendríticos. Expresan los marcadores pan T (CD2, 3, 5), pero con frecuencia hay pérdida del CD7 (75% de los casos). La mayoría son CD4+, aunque hay casos CD8+.

Los pacientes son adultos mayores, que presentan múltiples placas o nódulos cutáneos o eritrodermia. En algunos casos, como evento final, puede desarrollarse un linfoma de células grandes, con características del linfoma de células grandes anaplásicas CD30+.

Leucemia/ linfoma T del adulto

Este linfoma es endémico en Japón, algunas zonas del Caribe y Brasil. Es causado por el HTLV-1. La histología es variable. El patrón en ganglios es difuso, con una población mixta de células pequeñas y grandes atípicas, que muestra un marcado pleomorfismo nuclear. Se pueden observar células con núcleos “en trébol” en sangre periférica. El compromiso medular es focal o extenso. Son células CD4+/CD25+ y frecuentemente CD7-.

La mayoría de los pacientes son adultos y se presentan con enfermedad avanzada: linfadenopatías generalizadas, lesiones en piel, hígado, bazo y hueso (imágenes líticas). Con frecuencia poseen hipercalcemia. Tienen un curso agresivo, con sobrevida de menos de un año.

Linfoma T/NK extranodal, nasal y tipo nasal

También se ha llamado linfoma T angiocéntrico. El linfoma T/NK nasal es una de las entidades que causa el síndrome clínico de granuloma letal de la línea media o reticulosis polimórfica. Puede comprometer otros sitios del aparato respiratorio, como laringe, bronquios y pulmón. El de tipo nasal tiene predilección por piel, tejidos blandos, tracto gastrointestinal y testículos. Los tres tipos están asociados al EBV; sin embargo, algunos casos de morfología similar y asociación con EBV, son B y, por lo tanto, representan otra entidad. Es más frecuente en Asia, México, Centro y Sudamérica.

La citología es variable, con franca angioinvasión y angiodestrucción tanto de arterias como de venas, con la consecuente necrosis extensa. Se encuentran linfocitos pequeños, regulares y un número variable de células linfoides atípicas e inmunoblastos, junto con células plasmáticas y ocasionales eosinófilos e histiocitos.

Frecuentemente, no expresan ningún marcador T, excepto CD2. Algunos casos expresan CD56, un marcador de células NK y linfocitos T activados. Pueden ser CD4+ o CD8+. Suelen ser positivos para la fracción épsilon de CD3 y tienen un curso agresivo.

Linfoma T asociado a enteropatía

Antiguamente se le llamó “histiocitosis maligna del intestino”. Se manifiesta como ulceraciones del yeyuno, frecuentemente múltiples, con marcado riesgo de perforación, con o sin masa asociada. No obstante, también puede afectar colon. Pueden manifestarse clínicamente como perforación, obstrucción o hemorragia intestinal.

El cuadro histológico es variable, pero muestra una citología mixta de células pequeñas, medianas y grandes o anaplásicas, con múltiples linfocitos intraepiteliales en la mucosa suprayacente. La mucosa adyacente puede presentar atrofia de las vellosidades y linfocitosis intraepitelial. En algunos casos, hay abundantes eosinófilos o histiocitos.

Las células expresan CD2, CD7, CD3 y ocasionalmente CD8, con CD4 y CD5 ausentes en la mayoría de los casos. Algunos pueden expresar CD30 o las moléculas citotóxicas (perforina, TIA-1, granzima B). El EBV usualmente es negativo. Además, expresan CD103, un marcador de la integrina específica de célula epitelial, que promueve la interacción entre los linfocitos T CD8+ de la mucosa o dermis y el epitelio. Junto con la E-cadherina, es un receptor de anidación (“*homing*”) de linfocitos a esas dos localizaciones. Por lo tanto, se encuentra en el linfoma T intestinal y en las formas tempranas del linfoma cutáneo T, pero no se expresa en linfomas T en otros sitios.

Es una enfermedad de adultos mayores. Algunos tienen historia de enteropatía sensible a gluten, de corta o larga data; también se asocia a dermatitis herpetiforme. Raramente, puede presentarse en un inicio en otros sitios extraganglionares, como piel o pulmón.

El curso es agresivo y las muertes frecuentemente son por perforaciones intestinales múltiples.

Linfoma T angioinmunoblástico

Es una entidad rara. Tiene una clínica muy particular, de linfadenopatías generalizadas, fiebre, pérdida de peso, exantema, hipergammaglobulinemia policlonal y anemia hemolítica. Algunos hematopatólogos consideran que ya desde la etapa de linfadenopatía angioinmunoblástica realmente son linfomas T, porque

aún en esa etapa se logra demostrar rearreglo T monoclonal. Otros prefieren llamarlo linfoma hasta que se encuentran conglomerados de células T. Compromete ganglios, bazo y médula ósea, y con frecuencia tiene presentación inicial extranodal (pulmón, tracto GI, anillo de Waldeyer).

La arquitectura del ganglio afectado está difusamente borrada, con hipocelularidad, con sinusoides permeables y sin folículos o con folículos atróficos. La población es mixta, con presencia de células claras, mezcladas con linfocitos pequeños, eosinófilos, células plasmáticas e histiocitos epitelioides. Puede haber agregados de inmunoblastos intralinfáticos o intravasculares. El proceso se extiende fuera de la cápsula ganglionar. Hay una proliferación arborizante de vénulas post-capilares con endotelio alto y una proliferación de células foliculares dendríticas alrededor de estas vénulas, lo cual se evidencia con el marcador CD21.

La mayoría de las células son CD4+. Además, en la mayoría de los casos hay expresión aberrante de CD10, excepto en MO, lo cual lo distingue de los otros LTP.

Se ha asociado a EBV. Muchos casos tienen trisomía 3 y/o 5 y un cromosoma X adicional.

El curso es moderadamente agresivo, con ocasionales remisiones o con respuestas prolongadas a terapia esteroidea. En forma eventual, desarrollan un linfoma T franco o, con menor frecuencia, un linfoma B.

El diagnóstico diferencial es con linfadenopatías virales y reacciones a drogas. Algunos autores consideran que las linfadenopatías angioinmunoblasticas son precursoras.

Linfoma hepatoesplénico de células T

Es raro. Hay compromiso preferencial de los sinusoides hepáticos, esplénicos y medulares. Suele tener pérdida de expresión de CD5 y CD7. Tiene rearreglo de las cadenas γ y δ , aunque raros casos pueden tener α y β , que son las expresadas en el 95% de los linfocitos T normales.

Linfoma T subcutáneo paniculítico

Descrito por primera vez en 1991, es un linfoma T raro, de personas adultas (19-54 años), que usualmente permanece localizado en el tejido celular subcutáneo, con regresiones y exacerbaciones. Se presenta como nódulos únicos o múltiples, por lo general en extremidades superiores o inferiores, con

poco compromiso de tronco. Las lesiones pueden medir entre 1 y 12 cm. No se acompaña de síntomas generales, a menos que se asocie al síndrome hemofagocítico, una complicación frecuente (hasta en un tercio de los casos), que constituye la causa de muerte en los casos fatales.

Histológicamente, las lesiones son reminiscentes de paniculitis, con necrosis grasa y cariorrexis y con reacción histiocítica, células gigantes y granulomas. El infiltrado linfoide es muy variable; está compuesto por una mezcla de linfocitos pequeños y grandes, algunos atípicos, con mitosis. No hay angiocentricidad ni angiodestrucción, como en el linfoma T, tipo nasal, de piel.

De acuerdo con la caracterización inmunohistoquímica, tienen inmunofenotipo T maduro, sin ningún patrón definido, con pérdida esporádica aberrante de CD5 o CD7. Pueden expresar CD4 o CD8. No se asocia con EBV.

Linfoma anaplásico de células T grandes (LACG)

Existen dos formas de este tipo de linfoma, que por definición expresa CD30. Puede tener compromiso cutáneo, pero como parte de diseminación, con otros sitios comprometidos. Se asocia con la translocación t(2;5)(p23;q35). A diferencia de la forma cutánea primaria, generalmente expresa EMA y no expresa CLA. Su comportamiento es de agresividad moderada, pero curable con quimioterapia y no tiene remisiones espontáneas. Puede presentar recaídas tardías.

Representa el 2-5% de los LNH. Tiene una distribución etaria bimodal, con un pico en la infancia y otro en la edad adulta y predomina en hombres. Usualmente, se presenta en estadios clínico I o II, con compromiso de ganglios o de sitios extraganglionares.

Existen variantes histológicas, que han sido identificadas por la expresión de un nuevo anticuerpo llamado ALK (ver apartado siguiente) y por la presencia de una célula llamada "*hallmark cell*", una célula grande con abundante citoplasma, un núcleo excéntrico, reniforme o en forma de herradura y una zona de Golgi eosinofílica:

1. LACTG, ALK-1 positivo.
2. LACTG, ALK-1 negativo.

- LACTG, ALK-1 positivo

En este linfoma los ganglios tienen una infiltración predominantemente sinusoidal, aunque también puede ser paracortical o difusa. Las células tumorales

son grandes, con núcleos muy pleomórficos y nucléolos prominentes. Las células multinucleadas son frecuentes y pueden ser semejantes a células de Reed-Sternberg, o con núcleos distribuidos “en corona”. Pueden tener aspecto cohesivo, simulando carcinoma o melanoma metastásicos. Con frecuencia, hay células plasmáticas, eosinófilos, neutrófilos e histiocitos.

Las células tumorales expresan CD30, en patrón paranuclear y/o de membrana; junto con estos patrones puede haber expresión citoplasmática, pero la presencia de esta aislada, sin positividad en la membrana celular o el aparato de Golgi, no debe ser tomada como positiva. El CD30 es un marcador de activación linfoide, miembro de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral/ factor de crecimiento neural. El 75% expresa antígeno leucocitario común (CD45) y EMA.

Dos tercios de los casos expresan inmunofenotipo T, pero con pérdida aberrante de algunos de los marcadores T. Un 15% no expresa marcadores T ni B (células nulas). El 10% restante expresa inmunofenotipo B. Sin embargo, estos linfomas aunque tienen la misma morfología e inmunofenotipo, excepto que expresan marcadores B, no se consideran parte de esta categoría, porque se comportan como el resto de los linfomas de células B grandes, con un pronóstico un poco más reservado y sin remisiones espontáneas.

La translocación t(2;5)(p23;q35) fusiona al gen de la nucleofosfamina (NPM) en el cromosoma 5, con el dominio catalítico de la quinasa del linfoma anaplásico (ALK). El trastorno de la regulación del ALK resultante puede que contribuya a la transformación maligna. En la actualidad, se ha desarrollado un anticuerpo dirigido contra la proteína de fusión, denominado ALK1 o p80NPM/ALK. La positividad de este en el núcleo y en el citoplasma correlaciona con la presencia de la translocación t(2;5). Algunos casos que son ALK+, pero solo en el citoplasma, sin tinción nuclear, no tienen dicha translocación. Más bien se trata de sobreexpresión de la proteína completa, que podría estar en relación con otras alteraciones cromosómicas, como las translocaciones t(1;2), (5;6), (3;5) o inversión 2(p23;q35). Si se divide a los linfomas en dos categorías, ALK+ y ALK-, se observa que hay comportamiento distinto entre ambos grupos. Los linfomas ALK+ son más frecuentes en niños (88% versus 34% en adultos) y no tienen una curva etaria bimodal; además, son primarios sistémicos, de inmunofenotipo T o nulo, con frecuente expresión de EMA y no se relacionan con EBV. Más importante, tienen una sobrevida a 10 años mejor que los que son ALK- (70% versus 35%).

- LACTG, ALK-1 negativo

El LACTG, ALK-1 negativo se incluye en la clasificación de la OMS como una entidad provisional. Morfológicamente es indistinguible del LACTG, ALK-1 positivo. El inmunofenotipo también es similar, con la obvia excepción de que son negativos para ALK-1. Sin embargo, clínicamente, es más frecuente en adultos, en especial entre las edades 40-65 años de edad, aunque se puede dar a cualquier edad. Además, presentan un pronóstico mucho más reservado. Se debe diferenciar del linfoma de células T periférico con expresión de CD30.

Desórdenes linfoproliferativos de células T positivos para CD30, primarios cutáneos

Existen dos formas de este tipo de linfoma, que por definición expresa CD30 en el 70% o más de su población. Tiempo atrás, se le llamó histiocitosis maligna o histiocitosis atípica.

- LACTG primario cutáneo

Solo presenta compromiso cutáneo, como nódulos únicos o múltiples (Figura N° 7). Se separa de la forma secundaria que aparece en pacientes portadores de micosis fungoides. Por lo general, no tiene la translocación t(2;5), que caracteriza a la forma sistémica. Ocurre predominantemente en adultos. Las células tumorales por lo general no expresan EMA, como en la forma sistémica, y expresan CLA (antígeno linfocítico cutáneo, HECA-425). Pueden presentar remisiones espontáneas. Muestra una imagen histológica continua con la papulosis linfomatoide tipo A. Es de curso indolente en la mayoría de los casos, pero incurable.

- Papulosis linfomatoide

Es una enfermedad crónica de la piel, recurrente, que se caracteriza por la presencia de células grandes, atípicas, anaplásicas, con un inmunofenotipo similar al LACTG. Se diferencia del anterior por un curso clínico caracterizado por lesiones que desaparecen por sí solas y porque recurren periódicamente. Al igual que los LACTG, son de curso prolongado e indolente.

Enfermedad linfoproliferativa de la infancia positiva para virus de Epstein-Barr

En esta categoría se incluyen dos entidades: el linfoma semejante a hidroa vacciniiforme y la enfermedad linfoproliferativa sistémica de células T positiva para EBV de la infancia.

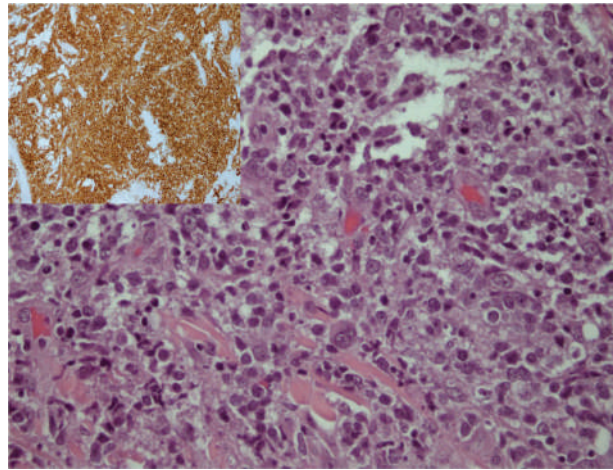


Figura N° 7. H&E, 40x. Linfoma de células T grandes, primario cutáneo. Se observan células linfoides grandes, tumorales, con abundante citoplasma claro y núcleo vesiculoso, algunas con morfología similar a células de Reed-Sternberg. Con inmunohistoquímica se evidencia que las células grandes tumorales son de inmunofenotipo T, CD30+, expresado en más de un 70% de las células tumorales (recuadro, 10x).

- Linfoma semejante a hidroa vacciniforme

Este trastorno linfoproliferativo es más frecuente de células asesinas naturales (NK), aunque puede ser derivado de células T. La mayoría de los casos se presenta en niños, usualmente en Asia, América del Sur y América Central. Se caracteriza por una erupción papulovesicular en piel expuesta, casi siempre en cara, que con frecuencia evoluciona a ulceración. En algunos casos, se asocia a síntomas generales, como fiebre, pérdida de peso, linfadenopatías y hepatoesplenomegalia. El factor precipitante parece ser dado por picaduras de insectos. Los infiltrados cutáneos son CD56 (+) y EBV (+); estos comprometen desde la epidermis hasta la hipodermis y muestran necrosis, angiocentricidad y angioinvasión. Puede asociarse al síndrome hemofagocítico. Algunos consideran a este linfoma una variante del linfoma T/NK tipo nasal. La respuesta a quimioterapia es baja y el pronóstico es reservado.

Linfomas no Hodgkin en niños

En niños, más del 95% de los casos de linfomas no Hodgkin son de los siguientes cuatro tipos:

1. Linfoma linfoblástico (de células precursoras B o T).
2. Linfoma Burkitt, clásico o atípico.
3. Linfoma difuso de células B grandes.
4. Linfoma anaplásico de células T grandes.

Los linfomas de curso indolente, como los linfomas foliculares, son raros. Se pueden presentar otros linfomas, como linfomas de la zona marginal, linfomas

T periféricos, linfoma hepatoesplénico, micosis fungoides y neoplasias NK.

El linfoma linfoblástico constituye el 30% de los casos y la mayoría son de origen T, con expresión frecuente de CD1a, TdT y coexpresión de CD4 y CD8. El CD3 suele ser citoplásmico y no de superficie, y un 30-50% expresa CD10. Se define leucemia linfoblástica aguda cuando se encuentran más de 25% de blastos en médula ósea se considera leucemia. El linfoma linfoblástico T suele presentarse como masa mediastinal o supradiafragmática, con o sin derrame pleural y variable linfadenopatía cervical. En cambio, el linfoma linfoblástico B, que representa aproximadamente un 10%, suele presentarse en piel, tejidos blandos, hueso, amígdalas o ganglios periféricos. El tratamiento con esquemas como de leucemia, logra una sobrevida libre de enfermedad de hasta 85-90%.

El linfoma Burkitt representa alrededor del 40% de los casos. La mayoría son del tipo esporádico, sin evidencia de EBV (menos del 30% de los casos). Con los regímenes de tratamiento actuales, el compromiso del SNC no tiene un impacto adverso evidente.

El LDCBG representa alrededor del 20% de los casos pediátricos, sobre todo en niños mayores y adolescentes. El 70% se presenta en estadio III, con compromiso de mediastino, abdomen, amígdalas, testículo u otros órganos extraganglionares. La sobrevida después de quimioterapia es de 90-100% para estadios bajos (I-II) y 80-95% para estados altos a tres años plazo.

El linfoma anaplásico de células T grandes comprende un 10% de los casos pediátricos. Usualmente, se presenta en estadios altos, y un 40-60% se presenta en sitios extranodales (hueso, tejidos blandos, piel) y ganglionares. En niños se han descrito todas las variantes morfológicas. A diferencia de los adultos, que expresan ALK solo en el 50-60%, en niños esta se encuentra sobreexpresada en más del 95% de los casos. Las recaídas tardías son frecuentes, por lo general 4-8 años después del diagnóstico inicial. Los factores de peor pronóstico son compromiso extenso de piel u otros órganos, y síntomas B. El tratamiento puede ser con CHOP o con APO (doxorrubinina, prednisona y vincristina). La sobrevida a cinco años es de 50-60%, por las recaídas tardías.

El reto permanece en encontrar el balance entre niveles curativos de quimioterapia y el efecto tóxico de esta, como esterilidad, cardiotoxicidad y tumores secundarios. Una posibilidad es el uso de inmunoterapia.

RESUMEN

- Los linfomas no Hodgkin son neoplasias que resultan de la expansión clonal de linfocitos B o T.
- En los LNH la alteración genética más frecuente es la translocación cromosómica, que lleva a la sobreexpresión de un oncogén que provoca una ventaja proliferativa o de sobrevida al linfocito afectado.
- La mayoría de los LNH se originan de linfocitos B.
- Existen muchos subtipos de linfomas con características clínicas, morfológicas y moleculares distintas.
- La clasificación de la OMS agrupa los linfomas de acuerdo a las características clínicas, morfológicas, inmunofenotípicas y genéticas de los linfomas.
- Durante su ontogenia, los linfocitos expresan de manera temporal o permanente una serie de proteínas específicas para cada etapa de maduración, lo cual es de utilidad para esclarecer los eventos que conducen a la formación de las diferentes poblaciones de linfocitos.
- El LNH más frecuente es el linfoma difuso de células B grandes, seguido por el linfoma folicular.
- La evaluación morfológica junto con el análisis inmunofenotípico son indispensables para el diagnóstico y la clasificación correcta de los linfomas.
- En Occidente los linfomas T representan menos del 15% de todos los linfomas.
- Los diferentes tipos de linfoma se tratan de manera distinta y poseen diferente pronóstico, por lo que es indispensable hacer la correcta clasificación de estos.

BIBLIOGRAFÍA

- Bagg A, Kallakury BVS. Molecular pathology of leukemia and lymphoma. *Am J Clin Pathol* 1999; 112 (Suppl. 1): S76-S92.
- Bahler DW, Aguilera NS, Chen CC, Abbondanzo SL, Swerdlow SH. Histological and immunoglobulin VH gene analysis of interfollicular small lymphocytic lymphoma provides evidence for two types. *Am J Pathol* 2000; 157(4): 11063-11070.
- Brecher M, Banks P. Hodgkin's disease variant of Richter's syndrome: report of eight cases. *Am J Clin Pathol* 1990; 93(3): 333-339.
- Chen HH, Hsiao CH, Chiu HC. Hydroa vacciniforme-like primary cutaneous CD8-positive T-cell lymphoma. *Br J Dermatol* 2002; 147(3): 587-591.
- Chu PG, Chang KL, Arber DA, Weiss LM. Immunophenotyping of hematopoietic neoplasms. *Sem Diagn Pathol* 2000; 17(3): 238-256.
- de Jong D, Boot H, van Heerde P, Hart GA, Taal BG. Histological grading in gastric lymphoma: pre-treatment criteria and clinical relevance. *Gastroenterology* 1997; 112(5): 1466-1474.
- Dictor M, Ek S, Sundberg M, Warenholt J, György C, Sernbo S, et al. Strong lymphoid nuclear expression of SOX11 transcription factor defines lymphoblastic neoplasms, mantle cell lymphoma and Burkitt's lymphoma. *Haematologica* 2009; 94(11): 1563-1568.
- Ek S, Dictor M, Jerkeman M, Jirstrom K, Borrebaeck CA. Nuclear expression of the non-B-cell lineage Sox11 transcription factor identifies mantle cell lymphoma. *Blood* 2008; 111(2): 800-805.
- Ferreri AJ, Ponzoni M, Guidoboni M, De Conciliis C, Giordano Resti A, Mazzi B, et al. Regression of ocular adnexal lymphoma after Chlamydia psittaci - eradicating antibiotic therapy. *J Clin Oncol* 2005; 23(22): 5067-5073.
- Garbe C, Stein H, Doenemann D, Orfanos CE. Borrelia burgdorferi - associated cutaneous B cell lymphoma: clinical and immunohistologic characterization of four cases. *J Am Acad Dermatol* 1991; 24(4): 584-590.
- Giandano G, Dalla-Favera R. The biology of high-grade non-Hodgkin's lymphoma. En: Canellos GP, Lister TA, Sklar JL. The lymphomas. Pennsylvania: W.B. Saunders Co.; 1998. p. 353-67.
- Hamilton-Dutoit S, Pallensen G, Franzmann M, Karkov J, Black F, Skinhoj P, et al. AIDS-related lymphoma: histopathology, immunophenotype and association with Epstein-Barr virus as demonstrated by in situ nucleic acid hybridization. *Am J Pathol* 1991; 138(1): 149-163.

Harris NL. Low-grade B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue and monocytoid B-cell lymphoma: related entities that are distinct from other low-grade B-cell lymphomas. *Arch Pathol Lab Med* 1993; 117(8): 771-775.

Küppers R, Klein R, Hansmann M-L, Rajewsky K. Cellular origin of human B-cell lymphomas. *N Engl J Med* 1999; 341(20): 1520-1529.

Lossos IS, Czerwinski DK, Alizadeh AA, Wechser MA, Tibshirani R, Botstein D, *et al.* Prediction of survival in diffuse large-B-cell lymphoma based on the expression of six genes. *N Engl J Med* 2004; 350(18): 1828-1837.

Martínez N, Camacho FI, Algara P, Rodríguez A, Dopazo A, Ruíz-Ballesteros E, *et al.* The molecular signature of mantle cell lymphoma reveals multiple signals favoring cell survival. *Cancer Res* 2003; 63(23): 8226-8232.

Moore I, Wright DH. Primary gastric lymphoma-a tumour of mucosa-associated lymphoid tissue. A histological and immunohistochemical study of 36 cases. *Histopathology* 1984; 8(6): 1025-1039.

Pescarmona E, De Sanctis V, Pistilli A, Pacchiarotti A, Martilli M, Guglielmi C, *et al.* Pathogenetic and clinical implications of Bcl-6 and Bcl-2 gene configuration in nodal diffuse large B-cell lymphoma. *J Pathol* 1997; 183(3): 281-286.

Rodig S, Savage K, LeCasse A, Weng AP, Harris NL, Shipp MA, *et al.* Expression of TRAF1 and nuclear c-REL distinguishes primary mediastinal large cell lymphoma from other types of diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol* 2007; 31(1): 106-112.

Savage KJ, Monti S, Kutok JL, Cattoretti G, Neuberg D, De Leval L, *et al.* The molecular signature of mediastinal large B-cell lymphoma differs from that of other diffuse large B-cell lymphomas and shares features with classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 2003; 102(12): 3871-3879.

Streubel B, Vinatzer U, Lamprecht A, Raderer M, Chott A. T(3;14)(p14.1;q32) involving IGH and FOXP1 is a novel recurrent chromosomal aberration in MALT lymphoma. *Leukemia* 2005; 19(4): 652-658.

Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, *et al.* WHO Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4 ed. Lyon: IARC; 2008.

SÍNDROMES LINFOPROLIFERATIVOS CRÓNICOS CON EXPRESIÓN LEUCÉMICA

*Dr. Juan E. Richmond Navarro
Dr. German F. Sáenz Renauld*

INTRODUCCIÓN

Los linfocitos son células del sistema inmune que se encargan de reconocer y responder de forma específica y adaptada ante distintos agentes extraños e inducir tolerancia frente a la estructura propia. En términos generales, se reconocen tres grandes grupos según su origen y función: linfocitos B, linfocitos T y las células natural killer (NK), un conjunto de células de aspecto linfocítico, que comparten con los linfocitos T algunos mecanismos efectores de la respuesta inmune.

Los síndromes linfoproliferativos crónicos (SLPC) constituyen un grupo heterogéneo de enfermedades caracterizadas por la expresión monoclonal de células linfocíticas de aspecto maduro, que reflejan las características de distintas subpoblaciones normales de linfocitos maduros, además de un comportamiento indolente y tendencia a manifestarse en sangre periférica (SP). De acuerdo a su fenotipo y origen, los SLPC se clasifican en: SLPC-B, SLPC-T y SLPC-NK. En general, los SLPC-B tienen una incidencia bastante superior a los SLPC-T, representando más del 90-95% de todas las enfermedades linfoproliferativas crónicas; además, conforman un grupo amplio de entidades diferentes, con características clínicas biológicamente bien definidas.

Cabe destacar que en la clasificación más reciente de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (año 2008), los SLPC-T y los SLPC-NK se consideran uno solo, debido a que algunos subtipos de estos presentan características clínicas, morfológicas y evolutivas similares, independientemente de la naturaleza de la célula involucrada, y claramente diferentes de las neoplasias de linfocitos B maduros.

De tal forma, según la clasificación de la OMS, los SLPC se dividen en: 1) SLPC primariamente leucémicos, que incluyen la leucemia linfocítica crónica (LLC), la leucemia prolinfocítica B y T (LPL-B, LPL-T) y la tricoleucemia (TL), tanto en sus formas clásicas como atípicas o variantes; y 2) aquellos en donde la leucemización se produce de manera secundaria a partir del ganglio linfático o piel (por ejemplo: linfomas leucemizados, linfomas cutáneos y leucemia/linfoma T

del adulto) (Cuadro N° 1).

Clásicamente, ante la sospecha de existencia de un proceso leucémico y/o linfomatoso, el abordaje diagnóstico y la caracterización de la hemopatía maligna se fundamentaba en estudios citomorfológicos e histopatológicos de SP, médula ósea (MO), órgano linfocítico secundario y otros tejidos. No obstante, en las últimas décadas se han introducido nuevas herramientas de apoyo al diagnóstico, que han resultado útiles, en especial los recuentos celulares automatizados en contadores hematológicos en la primera fase y la caracterización fenotípica, citogenética y molecular de las células neoplásicas en una segunda fase. De forma paralela, desde finales de los años 80 la información fenotípica y genética se ha incorporado progresiva y masivamente a la práctica diagnóstica diaria, a través de las nuevas clasificaciones de consenso. Todo eso ha hecho que en la clasificación actual de las hemopatías malignas de la OMS, la definición de la gran mayoría de las distintas entidades incluidas dentro de cada subgrupo de hemopatías clonales tengan en cuenta simultáneamente criterios citomorfológicos, histopatológicos, inmunofenotípicos y genético-moleculares, junto con el comportamiento clínico de la enfermedad.

Los avances técnicos alcanzados y el empleo sistemático de estas nuevas herramientas en la rutina diagnóstica, ayudaron a que su aplicación se extendiera desde una posición de herramienta diagnóstica de segunda línea, al rastreo diagnóstico inicial y la monitorización del tratamiento. En el caso de las técnicas inmunofenotípicas, la evolución ha sido notable en los últimos años, sobre todo a partir del momento en que se han utilizado en la rutina marcadores simultáneos con tres o más anticuerpos analizados mediante citometría de flujo. Esta última proporciona un recuento fiable, bastante específico, sensible y reproducible de las distintas subpoblaciones celulares presentes en una muestra biológica. En este campo, el éxito de los análisis multiparamétricos por citometría de flujo ha sido particularmente evidente en el rastreo diagnóstico de los síndromes linfoproliferativos crónicos, ya sea en muestras de SP, médula ósea (MO), tejido linfocítico o en diferentes líquidos corporales como el líquido cefalorraquídeo (LCR) y el líquido

pleural. Por tanto, en el rastreo de clonalidad en los síndromes linfoproliferativos crónicos, la citometría de flujo se ha convertido en uno de los métodos más empleados para la caracterización diagnóstica

de los SLPC-B y ha contribuido en gran medida a la correcta caracterización y diagnóstico de los SLPC con expresión en sangre y médula ósea.

Cuadro N° 1. Síndromes linfoproliferativos crónicos

- a) SLPC primariamente leucémicos:
 - a. Leucemia linfocítica crónica filadelfia (LLC).
 - b. Leucemia prolinfocítica B (LPL-B).
 - c. Tricoleucemia.
- b) Linfomas no Hodgkin B con expresión periférica:
 - a. Linfoma folicular.
 - b. Linfoma de células del manto.
 - c. Linfoma de células grandes.
 - d. Linfoma Burkitt.
 - e. Linfoma de la zona marginal esplénico y nodal.
 - f. Linfoma de la zona marginal extranodal tipo MALT.
 - g. Linfoma linfoplasmocítico.
- c) SLPC -T y SLPC -NK:
 - a. Leucemia/linfoma T del adulto.
 - b. Leucemia prolinfocítica T.
 - c. Síndrome de Sézary.

En cuanto al tratamiento, se han experimentado importantes avances. En un inicio este se basaba en los agentes alquilantes solos o en combinación, con los que se alcanzaban muy pocas respuestas completas y de corta duración. Posteriormente, se introdujeron los análogos de purinas (avance terapéutico más interesante experimentado en este grupo de enfermedades), con lo cual se ha podido cambiar la historia natural de algunas entidades, como en la tricoleucemia (gracias a la desoxicoformicina o la 2-clorodeoxiadenosina (cladribine)), y se ha profundizado en la calidad de las respuestas, como en la leucemia linfática crónica (en virtud del empleo de la fludarabina en combinación con otros agentes). Otro logro terapéutico importante fue la utilización de anticuerpos monoclonales como el antiCD20 (rituximab) y el alemtuzumab (anticuerpo monoclonal humanizado frente al antígeno CD52), particularmente en combinación con otros fármacos, con lo que los resultados terapéuticos son en verdad esperanzadores. En los últimos años, la introducción de la bendamustina, agente alquilante, en combinación con otros fármacos, principalmente anticuerpos monoclonales anti CD20, se ha logrado obtener excelentes respuestas tanto en leucemia linfocítica crónica como en algunos linfomas no Hodgkin.

En general, el trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos está en desuso; en caso de utilizarse se debe individualizar, siendo quizás el candidato idóneo el paciente con mal pronóstico, sin donante HLA idéntico no emparentado. Con este tipo de trasplante se logra conseguir prolongar la sobrevida libre de progresión, aunque no tiene efecto sobre la sobrevida global.

Con respecto al trasplante alogénico, en primera línea la indicación actual incluye solo a los pacientes con delecciones/mutaciones en p53; mientras que en segunda línea son candidatos aquellos pacientes con refractariedad a la primera línea de inmunoterapia que incluya análogos de purinas, mutación en p53 o del 17p, recaída precoz (menor a 24 meses) tras inmunoterapia con análogos de purinas o autotrasplante.

Criterios generales que se deben tomar en cuenta para el diagnóstico de los SLPC

- El frotis de sangre periférica, que resulta excelente para evaluar la morfología de los linfocitos, aunque también se puede evaluar en frotis de MO u otros tejidos.

- γ El hemograma y el inmunofenotipo, que constituyen las pruebas más importantes.
- γ El estudio histopatológico de la médula ósea, ganglios linfáticos y otros tejidos infiltrados, a fin de ver la distribución que tienen allí los linfocitos.
- γ Los estudios citogenéticos y de biología molecular.
- γ La citometría de flujo, que se ha convertido desde hace un tiempo en uno de los métodos más empleados para la caracterización diagnóstica de los SLPC.

**SÍNDROMES LINFOPROLIFERATIVOS
CRÓNICOS-B CON EXPRESIÓN LEUCÉMICA**

Como ya se mencionó, bajo el término de SLPC-B primariamente leucémicos se incluyen, según la última clasificación de la OMS, la LLC-B, la leucemia prolinfocítica (LPL)-B y la TL, tanto en sus formas clásicas como atípicas o variantes.

Leucemia linfocítica crónica B (LLC-B)

La leucemia linfocítica crónica (LLC) es la neoplasia hematológica más frecuente en los países occidentales. La incidencia aumenta con la edad, siendo poco frecuente antes de los 50 años (incidencia 5/100.000 habitantes/año, representando menos del 20% de todos los diagnósticos); después de esta edad se incrementa de forma importante hasta llegar a 30/100.000 habitantes/año en personas mayores de 70 años.

La LLC es una enfermedad con un curso clínico muy heterogéneo. Así, la mitad de los pacientes nunca presentarán progresión de su enfermedad, con una expectativa de vida similar a la de la población general normal, mientras que la otra mitad va a precisar algún tratamiento a lo largo del curso de su enfermedad y su expectativa de vida se verá acortada como consecuencia de la enfermedad.

Con los tratamientos actuales se consiguen tasas de respuesta elevadas; sin embargo, la LLC sigue siendo una enfermedad incurable y la mayoría de pacientes recaen a lo largo de la evolución de la enfermedad. Por consiguiente, la falta de un tratamiento curativo, la prolongada secuencia de respuestas y recaídas, así como su prevalencia en poblaciones de edad avanzada con frecuentes comorbilidades asociadas, influyen en la ausencia de tratamientos estándares para cada una de las situaciones que plantea la enfermedad.

Se caracteriza por la proliferación y acumulación de linfocitos inmunoincompetentes de tamaño pequeño, CD5+, aspecto maduro y fenotipo B, en la sangre periférica, médula ósea y los tejidos linfoides. Las causas de esta leucemia son desconocidas, aunque parece que factores genéticos contribuyen a su desarrollo. Se hallan alteraciones cromosómicas en aproximadamente el 80% de los pacientes y las anomalías más frecuentes son la del(13q14) (55% de los casos); del(11q22-q23) (18% de los casos); + (12q13) (16% de los casos); del(17p13) (7% de los casos) y del(6q21) (6% de los casos) (Cuadro N° 2).

Cuadro N° 2. Correlación entre anomalías citogenéticas y características clinicoevolutivas de la LLC	
Anomalía citogenética	Características
del(13q14) aislada	Buen pronóstico.
Trisomía 12	Presencia de prolinfocitos en sangre periférica. Inmunofenotipo atípico. Sin influencia en el pronóstico.
del(6q)	Pacientes jóvenes, predominio en varones, formas tumorales. Sin influencia en el pronóstico.
del(11q)	Pacientes jóvenes, predominio en varones, formas tumorales de la enfermedad y resistente al tratamiento. Mal pronóstico.
del(17p)	Formas progresivas de la enfermedad, resistencia al tratamiento. Muy mal pronóstico.

El linfoma linfocítico de células B pequeñas está íntimamente relacionado con la LLC-B, siendo superponible el fenotipo de los linfocitos B patológicos en ambas entidades.

Frecuencia y epidemiología

- γ La LLC-B es la leucemia más frecuente en EEUU y Europa, con una incidencia de 2,7 casos por cada 100.000 habitantes, y constituye alrededor del 0,8% de todos los cánceres y el 30% de todas las leucemias. En raza blanca americana es más frecuente que en raza negra; se ha sugerido una tendencia familiar, pero no se reportan patrones de herencia.
- γ No se ha encontrado asociación con radiaciones ionizantes, virus o químicos.
- γ La edad media al diagnóstico es de 68-70 años, es más frecuente en varones que en mujeres (2:1), y entre un 40% y un 50% de los pacientes son mayores de 70 años.
- γ Al momento del diagnóstico, el 90% de los pacientes tiene más de 50 años de edad.
- γ No existe terapia curativa y la supervivencia depende del grado de diseminación del tumor al diagnóstico. En general, en etapas tempranas del padecimiento y cuando no hay complicaciones, no se da terapia antileucémica y la sobrevida es mayor.
- γ De forma esporádica se observa en adultos jóvenes, aunque es extremadamente rara en menores de 25 años.

Diagnóstico

El diagnóstico de la LLC se basa en los criterios del IWCLL, por lo que se hace necesaria la realización de:

- γ Hemograma con recuento diferencial: permite establecer la aparición de una linfocitosis y la situación del resto de líneas hematológicas, por lo general superior a 5.000/ul
- γ Valoración de la morfología de SP: permite diferenciar la LLC de otros síndromes linfoproliferativos.

Clasificación

Desde un punto de vista citológico se clasifica en:

- γ LCC típica: linfocitos de pequeño tamaño, aspecto maduro con núcleo regular, cromatina compacta, ausencia de nucléolo visible y un citoplasma escaso, dispuesto como un fino anillo alrededor del núcleo. Una pequeña proporción de células no superior al 10% puede mostrar aspecto prolinfocitoide o con núcleo irregular.

- γ LLC atípica: están asociadas a peor pronóstico y pueden subdividirse en:

- LLC con aumento de prolinfocitos (> 10% y < 55%), que se designa como LLC/LP.
- LC atípica, con diferenciación linfoplasmocítica y/o presencia de células hendidas.

Características de la membrana de los linfocitos de la LLC-B

Estos linfocitos, aunque son de aspecto maduro, inmunológicamente son inmaduros, como lo demuestran los siguientes aspectos:

- γ Presentan receptores para eritrocitos de ratón y forman, por tanto, rosetas con ellos (rosetas M muy aumentas).
- γ Tienen cantidades relativamente pequeñas de inmunoglobulina de superficie (IgS).
- γ A veces presentan Ig citoplasmática (IgC).
- γ En todos los casos de LLC-B se encuentra presente el antígeno de superficie cLLa.
- γ En la LLC-B hay un descenso importante en la actividad de la fosfatasa ácida y de la beta glucuronidasa, que se detecta desde fases precoces de la enfermedad. Esto permite hacer el diagnóstico diferencial con otras linfocitosis reactivas.
- γ Estos linfocitos son PAS positivos, generalmente, con granulación perinuclear.

Valor del inmunofenotipo en las LLC-B

No existen marcadores específicos, por lo que se recurre a un panel integrado por varios antígenos y definido por:

- γ Expresión de los antígenos de línea T CD5 y CD43, más el antígeno CD23.
- γ Expresión de CD19 con débil expresión de otros antígenos de línea B: CD22, CD20, Fmc7 y CD79b. La expresión de Fmc7 y CD79b suele estar ausente con frecuencia.
- γ Expresión débil o incluso ausente de inmunoglobulinas de superficie (slg) con restricción de cadenas ligeras kappa o lambda (nunca las dos), como dato de monoclonalidad.

La LLC-B típica presenta de forma constante expresión de CD5, CD23 y CD200 en células B neoplásicas CD19+, siendo este último marcador (CD200) clave junto con CD79b para diferenciar la LLC-B del LCM. En las formas atípicas de la enfermedad, este patrón fenotípico puede verse modificado, adoptando distintos perfiles. Merece destacar que la reactividad

para algunos de marcadores, como CD38 y CyZAP-70 (presente en casi la mitad de los casos), se ha asociado con el estado mutacional de los genes de las cadenas pesadas de las Ig (genes IGH) –ausencia de mutaciones somáticas– y/o un peor pronóstico de la enfermedad; a este respecto merece destacar que también la positividad para CD49d en LLC– B no mutadas se ha asociado con un peor pronóstico.

Estudio de MO

El aspirado de MO revela una infiltración por elementos linfoides de características idénticas a los de sangre periférica. En la biopsia de MO se han definido diferentes patrones de infiltración:

- a) Nodular: consiste en una infiltración por nódulos linfoides con conservación de la grasa y celularidad hematopoyética normal.
- b) Intersticial: infiltración linfoide intersticial, en donde los linfocitos están infiltrados entre las células hemopoyéticas normales, sin alterar la estructura de la MO.
- c) Mixto: consiste en una combinación de los dos patrones anteriores (nodular+intersticial).
- d) Difuso: casi no se observa celularidad hemopoyética ni grasa, debido a la existencia de una gran infiltración linfoide, “borrando” la arquitectura normal de la MO.

Cuadro clínico y hematológico

En la actualidad, en más de la mitad de los casos la LLC se descubre de forma casual, por un examen de rutina que evidencia leucocitosis con linfocitosis. En el resto, la astenia, la aparición de adenopatías aisladas o generalizadas, o las infecciones repetidas son las manifestaciones que llevan al diagnóstico. Se pueden acompañar por la presencia o no de esplenomegalia y/o hepatomegalia. A veces puede haber infiltración dérmica, que se manifiesta por enrojecimiento y engrosamiento de la piel.

En ocasiones, la primera manifestación es la presencia de infecciones (por hongos, virus o bacterias), como consecuencia de la neutropenia e hipogammaglobulinemia. La fatiga, palidez y cansancio puede ser el primer indicio de la LLC, originados por la anemia. En otros casos es la presencia de petequias, sangrado fácil al lavarse los dientes, epistaxis o equimosis espontáneas, debido a la trombocitopenia.

Al inicio puede o no haber anemia (15-20%); sin embargo, conforme la enfermedad progresa, se presenta y es normo-normo. En etapas más avanzadas se puede presentar, en cerca del 15% de los pacientes, anemia hemolítica autoinmune, Coombs positiva, debida a una IgG. En este caso, el frotis muestra esferocitos y macrocitos con basofilia difusa (policromacia). Las plaquetas, al diagnóstico, suelen ser normales, aunque puede presentarse trombocitopenia inmune, que se asocia principalmente con estados iniciales de la enfermedad.

Algunos pacientes desarrollan el síndrome de Evans, que es anemia y trombocitopenia autoinmunes. Casos de anemia normo-normo severa, con reticulocitopenia y plaquetas normales, sugieren aplasia selectiva de serie roja (infrecuente).

La hipogammaglobulinemia es una complicación frecuente (20-60% de los casos), sobre todo en pacientes con enfermedad avanzada y con infecciones de diversos tipos; se agrava conforme progresa la enfermedad y se debe a disminución de las Igs A, M y a veces G. En un 5-10% puede detectarse una gammapatía monoclonal (en especial IgM o IgG).

Las concentraciones séricas de ácido úrico, DHL, β_2 -microglobulina y bilirrubina total pueden elevarse. El curso clínico es muy variable. La mediana de supervivencia es de 8 a 10 años. Mientras que algunos pacientes fallecen pocos meses después del diagnóstico, otros no ven modificada su esperanza de vida. La supervivencia está en relación inversa a la gravedad de los síntomas al momento del diagnóstico.

La introducción de estadios clínicos significó un gran avance en el pronóstico de la LLC. Los sistemas más utilizados son los de Rai y el de Bidet (cuadros N° 3 y N°4). Además de los estadios clínicos, el grado de infiltración de la médula ósea, la cifra de linfocitos en sangre periférica, el tiempo de duplicación linfocitario, el número de prolinfocitos en sangre periférica y las alteraciones citogenéticas son los parámetros pronósticos más importantes.

Cuadro N° 3. LLC: Estadios de Rai		
Categoría	Mediana de supervivencia (años)	Mediana de supervivencia a los 10 años (%)
Riesgo bajo Estadio 0 - linfocitosis aislada	16	65
Riesgo intermedio Estadio I - Linfocitosis + adenopatías. Estadio II - Linfocitosis + hepatomegalia y/o esplenomegalia	8	45
Riesgo alto Estadio III - linfocitosis + anemia (Hb<11g/dl) Estadio IV - linfocitosis + trombocitopenia (plaquetas < 100 x 10 ⁹ /L)	2,5	15

Cuadro N° 4. LLC: Estadios de Bidet		
Categoría	Mediana de supervivencia (años)	Mediana de supervivencia a los 10 años (%)
Riesgo bajo Estadio A - linfocitosis aislada < 3 áreas linfoides afectadas*	15	65
Riesgo intermedio Estadio B - linfocitosis ≥ 3 áreas linfoides afectadas*	5	25
Riesgo alto Estadio C - anemia (Hb < 10g/dl) y/o trombocitopenia (< 100 x 10 ⁹ /L)	2,5	15

* Las áreas linfoides que se consideran en este sistema son: 1) adenopatías cervicales y/o supraclaviculares; 2) adenopatías axilares; 3) adenopatías inguinales (con independencia de que sean uni o bilaterales); 4) hígado y 5) bazo.

Complicaciones clínicas

Las complicaciones más frecuentes son las infecciones, los fenómenos autoinmunes, la transformación de la enfermedad y las segundas neoplasias.

- Infecciones: sobre todo en fases avanzadas de la enfermedad, debido a alteraciones de la inmunidad que acompañan a la LLC y a complicaciones

derivadas de la quimioterapia.

- Transformación: la forma más habitual (5-10%) es la transformación prolinfocitoide, cuando el porcentaje de prolinfocitos es > 54%, y se presentan tanto en SP como en MO. En el 3-10% se da la aparición de un linfoma de células grandes (síndrome de Richter), transformación linfomatoso que se observa en ganglios u otros tejidos. Las

células de Richter pueden aparecer o no en MO y SP. Cuando aparecen, se observan como blastos grandes, de cromatina fina y citoplasma basófilo, con nucléolo, rodeados de linfocitos pequeños de aspecto maduro.

- γ Segundas neoplasias: la incidencia es mayor que en la población general; alrededor del 10% de los pacientes presentan esta complicación.
- γ Fenómenos autoinmunes: un 15-35% presentan la prueba de Coombs positiva, aunque en ocasiones no se acompaña de una anemia hemolítica franca.

Tratamiento

El objetivo del tratamiento es prolongar la supervivencia de los enfermos y mejorar su calidad de vida.

Según los lineamientos establecidos, se debe iniciar tratamiento en los pacientes con enfermedad activa, definida esta por la presencia de uno de los siguientes criterios contemplados en las guías IWCLL (*International Workshop on CLL*):

- γ Fallo medular progresivo originado por desarrollo o empeoramiento de anemia o trombocitopenia.
- γ Esplenomegalia progresiva o masiva (> 6 cm por debajo del reborde costal).
- γ Conglomerados adenopáticos de gran tamaño (> 10 cm) o linfadenopatías de crecimiento progresivo.
- γ Tiempo de duplicación linfocitario ≤ 6 meses o incremento > 50% de la linfocitosis en dos meses.
- γ Anemia y/o trombocitopenia autoinmunes que no responden al tratamiento inmunosupresor.
- γ Pérdida de peso (> 10% en seis meses), astenia (ECOG > 2), fiebre > 38 °C (sin infección durante > 2 semanas) o sudoración nocturna (> 1 mes).

La presencia de hiperlinfocitosis aislada o hipogammaglobulinemia sin infecciones de repetición no son por sí mismas criterios para indicar tratamiento.

Modalidades terapéuticas

1. Monoquimioterapia: clorambucilo agente alquilante es el fármaco de elección; ciclofosfamida: es una alternativa al tratamiento con clorambucilo; corticosteroides: en general, se administran junto a alquilantes.
2. Poliquimioterapia: clorambucilo + prednisona es la combinación más utilizada. Otras combinaciones: ciclofosfamida, vincristina y prednisona (COP); ciclofosfamida, melfalán y prednisona (CMP);

ciclofosfamida, adriamicina, vincristina y prednisona (CHOP).

3. Análogos de las purinas: fludarabina se administra en casos resistentes al clorambucil o en recaídas; en estos casos también se puede suministrar la 2-CDA (2-clorodesoxiadenosina).
4. Nuevas opciones: utilización de anticuerpos monoclonales como el alemtuzumab (anti-CD52; Campath-1H), rituximab (anti-CD20, Mabthera) y bendamustina.

En pacientes jóvenes con datos de mal pronóstico se plantea la posibilidad de un trasplante de MO.

Tratamientos adicionales

- γ Infecciones repetidas: la gammaglobulina a altas dosis ha mostrado ser bastante eficaz en la prevención de algunas infecciones.
- γ Citopenias inmunes: anemia o trombocitopenia deben ser tratados con esteroides, añadiendo agentes citotóxicos en caso de no observarse respuesta.
- γ Esplenomegalia masiva o hiperesplenismo: esplenectomía o irradiación local.

Leucemia prolinfocítica B (LPC-B)

Se caracteriza por la presencia de gran esplenomegalia con escasas adenopatías y una elevada leucocitosis (en general > 100 x 10⁹/L) a expensas de unas células linfoides grandes con nucléolo prominente (prolinfocitos). Representa alrededor del 5-10% de todos los SLPC-B y afecta generalmente a personas mayores de 60 años. Existen dos variedades (B o T) con características clinicobiológicas diferenciales entre ellas. Un 75% de los casos son de inmunofenotipo B y un 25% de inmunofenotipo T.

Desde el punto de vista fenotípico, los prolinfocitos B son CD19+, CD20+/FMC7+, CD22+ y CD79b+, y expresan niveles elevados de sIgM y/o sIgD; además, respecto a la LLC-B, presentan menor reactividad para CD5 (20-30%), CD23 (10-20%) y CD25 (< 50%), marcadores que con relativa frecuencia son negativos en la LPL-B.

Características

- γ Altos recuentos de leucocitos y esplenomegalia masiva con o sin adenopatías pequeñas en la mayoría de casos.
- γ Más de un 55% de prolinfocitos en sangre periférica; el prolinfocito es una célula grande,

con citoplasma relativamente abundante, cromatina moderadamente condensada y un nucléolo prominente (a veces se observan dos). El citoplasma suele mostrar basofilia moderada.

- γ La fosfatasa ácida y la B glucuronidasa suelen estar disminuidas.
- γ En cerca de dos terceras partes de los pacientes se halla un cromosoma marcador 14q⁺ y con menos frecuencia t(11;14).
- γ Los rasgos clínicos más notables al diagnóstico son las molestias abdominales y la presencia de síntomas constitucionales.
- γ Con frecuencia, existe anemia normocítica y normocrómica y trombocitopenia; también presentan hipogamaglobulinemia como en la LLC-B.
- γ En el 25% de los casos se detecta un componente monoclonal en el suero.
- γ La LPL-T presenta una gran esplenomegalia, pero, a diferencia de la LPL-B, son más frecuentes las adenopatías (50%), así como las lesiones dérmicas (30%), derrames pleurales y la ascitis. Estos datos sugieren un curso clínico más tórpido.
- γ La biopsia ósea evidencia un patrón de infiltración difuso o mixto (nodular + intersticial).
- γ La LPLB es una enfermedad agresiva, para la cual el tratamiento óptimo no está aún establecido. La esplenectomía y el tratamiento con quimioterapia pueden dar remisiones parciales. Se puede utilizar la leucoaféresis en casos de gran leucocitosis. En la LPL-T el tratamiento con la desoxicoformicina puede resultar bastante eficaz.
- γ La mediana de supervivencia se sitúa en torno a los dos años, por lo que su pronóstico es peor que el de la LLC.

Tricoleucemia o leucemia de células peludas

Supone del 2% al 5% de todas las leucemias. El diagnóstico debe sospecharse ante la existencia de: citopenia con esplenomegalia, linfocitos circulantes con prolongaciones citoplasmáticas y aspirado seco. Es una enfermedad con claro predominio en hombres (80%) y se presenta sobre todo en la vida adulta, con una mediana de edad de 55 años.

Se caracteriza por presentar:

- γ Esplenomegalia prominente con escasas adenopatías.
- γ Las células peludas son más grandes que los linfocitos de la LLC, con citoplasma moderadamente abundante, de escasa basofilia y presenta unas proyecciones irregulares, semejantes a "pelos". El citoplasma puede contener gránulos azurófilos. El núcleo es excéntrico, de forma redonda, oval o arriñonada; la cromatina es fina y no posee

nucléolos o son poco evidentes, pequeños y, generalmente, únicos.

Hallazgos de laboratorio

- γ La pancitopenia es frecuente (70% al diagnóstico), con escasas células leucémicas en el frotis; hay neutropenia y la monocitopenia severa es usual.
- γ Con frecuencia hay reacción leucoeritroblástica y presencia de dacriocitos.
- γ Una minoría de pacientes cursan con leucocitosis y presentan mayor número de células leucémicas circulantes.
- γ La gran mayoría de casos de leucemia de células peludas (LCPE) son resistentes a la prueba de la fosfatasa ácida, adicionada de tartrato (FATR), que constituye una prueba citoquímica de gran valor en este diagnóstico.
- γ La MO suele ser difícil de aspirar en 50% de los casos, como consecuencia de la fibrosis reticulínica; en MO las células peludas son más abundantes que en SP.
- γ En la mayoría de los casos hay IgS.

Cuadro clínico

La mayoría de los pacientes consultan por los síntomas ocasionados por las citopenias o la esplenomegalia.

- γ Síntomas constitucionales.
- γ Pancitopenia (rasgo biológico más relevante); anemia: palidez, cansancio, fatiga fácil, somnolencia, etc.; neutropenia: propensión a diversas infecciones; trombocitopenia: petequias, equimosis espontáneas y sangrado de diversos tipos.
- γ Sensación de llenura y dolor abdominal debido a la esplenomegalia, que es moderada en el 85% de los casos y masiva (> 10 cm) en 20-25% de los pacientes.
- γ La hepatomegalia y las adenopatías son raras.
- γ La complicación más frecuente e importante son las infecciones (75%), motivadas por la neutropenia.
- γ Otros hallazgos: osteólisis, infiltración cutánea y fenómenos autoinmunes (vasculitis, artritis).

Inmunofenotipo

Por lo general, el diagnóstico de la LCPE se basa en la morfología de las células y la reacción de la FATR; sin embargo, en células de morfología atípica o muy escasas células peludas, el inmunofenotipo es de gran valor, pues este corresponde a células B relativamente maduras, que expresan positividad de los Ags CD19, CD20, CD22 y CD79a; las IgS son de moderadas a fuertes.

Tratamiento

La observación clínica estrecha sin tratamiento estaría indicada en enfermos: a) asintomáticos con solo una o dos citopenias y siempre que estas sean de carácter moderado (Hb >10g/dl, neutrófilos >1,0 x 10⁹/L y plaquetas >100 x 10⁹/L); b) en ausencia de infecciones y c) cuando la infiltración medular es < 50%. No obstante, solo un 5-10% de la LCPE cumple estos criterios. Se requiere tratamiento cuando no se cumplen los criterios de observación clínica o cuando hay leucocitosis, que corresponde a la fase leucémica de la enfermedad, y cuando hay esplenomegalia sintomática.

En la actualidad, se considera que los mejores resultados se obtienen con análogos de purinas como la 2-clorodeoxiadenosina (Cladribina:CDA).

La esplenectomía estaría restringida a las esplenomegalias masivas (con problemas mecánicos, infartos o rotura esplénica).

El cladribine es una antimetabolito notablemente efectivo, pues interfiere en la síntesis del ADN y ARN y favorece la apoptosis. La experiencia acumulada demuestra un 95% de respuestas, de las cuales un 85% fueron RC tras un ciclo de tratamiento.

El interferón humano o recombinante es útil en el tratamiento de la LCPE: disminuye el número de tricoleucocitos en SP y MO, mejora los recuentos celulares en SP y desaparece la esplenomegalia, pero no produce remisiones completas duraderas, y la mayor parte de los enfermos presentan una remisión parcial y recaen en menos de dos años a partir del momento en que se suspende el tratamiento.

El pronóstico de las personas con LCPE ha cambiado extraordinariamente con el advenimiento de estas drogas, sobre todo de la CDA, y la mayoría de los pacientes tratados con esta droga no muestran signos de la enfermedad meses y años después del tratamiento.

Variantes de la leucemia de células peludas (LCPE-V)

Existe una forma variante de LCPE que, al igual que la clásica, presenta esplenomegalia, anemia y trombocitopenia, pero que se caracteriza por tener leucocitosis. Es un desorden LPC-B raro, que difiere de la LCP clásica desde el punto de vista del inmunofenotipo, histológicamente y en cuanto al tratamiento.

Cuadro clínico y hematológico

- γ Esplenomegalia con escasas adenopatías.
- γ Generalmente cursa con leucocitosis (50-80.000/ul).
- γ Monocitos normales, a diferencia de la LCPE clásica que presenta monocitopenia.
- γ Puede haber anemia y trombocitopenia moderadas.
- γ Los tricoleucocitos suelen ser abundantes en SP y son de morfología distinta al típico tricoleucocito. Poseen mayor relación N/C, el citoplasma es más basófilo y el núcleo muestra una cromatina más condensada, con un prominente nucléolo. El núcleo, en efecto, se parece más al de un prolinfocito que al del tricoleucocito clásico. Algunas células pueden ser binucleadas.
- γ La reacción de FATR suele ser negativa.

Es importante distinguir la LCPE de la LCPE-V, pues en la segunda la terapia que se mencionó como altamente efectiva en la LCPE, es ineficaz.

LINFOMAS NO HODGKIN B CON EXPRESIÓN PERIFÉRICA

Los linfomas pueden tener células neoplásicas circulantes, produciendo, algunas veces, linfocitosis en la sangre periférica, que pueden ser confundidas con la LLC. En un inicio los LNH-B con expresión periférica se incluyeron bajo el término de leucemia de células linfomatosas. No obstante, hoy se sabe que corresponden a formas leucemizadas de distintos subtipos de LNH-B. En principio, todos los subtipos de LNH-B descritos hasta la fecha pueden leucemizarse, pero la expresión periférica es más frecuente en determinados subtipos de LNH-B. Por ello, ante la sospecha de que una linfocitosis B clonal pueda corresponder a una fase de leucemización de un LNH-B, es aconsejable realizar biopsia ganglionar para esclarecer el diagnóstico de LNH-B y definir su correspondiente subtipo histológico. Los linfomas que con más frecuencia pueden tener expresión hemoperiférica, son: linfoma folicular, linfoma de células del manto, linfoma linfocítico de células pequeñas, linfoma esplénico con linfocitos vellosos y linfomas difusos de células grandes (< 5%).

Linfoma folicular (LF)

De todos los linfomas primarios con infiltración de SP, el LF es el más frecuente. Aunque se ha estimado que la incidencia total de leucemización en el LF ocurre entre el 10% y el 40% de los casos, el uso de técnicas sensibles, como el análisis multiparamétrico por citometría de flujo de la expresión de varios antígenos celulares y la reacción en cadena de la

polimerasa (PCR), demuestran que las células B neoplásicas son detectables en la SP al diagnóstico o pueden aparecer después a lo largo de la evolución de la enfermedad, en una mayor proporción de casos. Estos cuadros pueden confundirse en ocasiones con la LLC-B, siendo útil para su diagnóstico diferencial la demostración de la existencia de linfocitos con núcleo hendido (centrocitos) y la presencia de cierto grado de polimorfismo celular, con la coexistencia de células pequeñas y grandes (centrocitos y centroblastos, respectivamente), en ausencia de sombras de Gümprécht. La histología ganglionar es esencial para el diagnóstico definitivo del LF.

Estos son linfomas de bajo grado de malignidad, con comportamiento indolente. En el pasado se le llamó a esta condición leucemia linfosarcomatosa crónica. Se trata de un linfoma que se desarrolla en los ganglios linfáticos, específicamente en el centro germinal, y que es, al menos en parte, centrofolicular. El patrón morfológico puede ser de tres tipos: 1) a base de células pequeñas; 2) mixtas, con células pequeñas y grandes o 3) con predominio de células grandes, con características clínico-patológicas similares al linfoma difuso de células grandes.

En su fase leucémica se observan dos tipos de células: centrocitos y centroblastos. Las células hendidas o centrocitos son de unas 6-12 micras de diámetro, con núcleo irregular y, a veces, de aspecto arriñonado; en otras ocasiones el núcleo muestra una o varias incisuras profundas que originan dos o más segmentos nucleares. La cromatina es densa, sobre todo en la periferia nuclear; a veces se observa un nucléolo; y el citoplasma puede ser muy escaso.

Los centroblastos, por su parte, son células de unas 16 micras, redondas, con núcleo redondo u oval, de cromatina fina, con nucléolo evidente, único (rara vez múltiple) y excéntrico; el citoplasma es escaso y basófilo.

Otras características

- γ Es una enfermedad de adultos, con incidencia igual en hombres y mujeres y, en ocasiones, mayor en sexo femenino.
- γ Cursa con adenopatías localizadas o generalizadas y con hepatoesplenomegalia en casos avanzados.
- γ Se puede descubrir en forma casual.
- γ Estas células expresan altos niveles de IgS; no expresan receptores de rosetas con eritrocitos de ratón, pero en algunos casos lo pueden expresar, aunque en menor grado que la LLC; no expresan el antígeno CD5.
- γ Manifiestan frecuentemente el antígeno CD10

(CALLA); estas células son FMC-7 positivas.

Linfoma de células del manto leucemizado (LCM)

El LCM representa alrededor del 5-10% de todos los LNH del adulto. En la mayoría de los LCM, las células B neoplásicas presentan un tamaño pequeño o mediano y aspecto maduro, similar al de la LLC-B; a veces, el núcleo es hendido con contorno irregular, asociado o no a la presencia de nucléolos evidentes con cromatina dispersa y escaso citoplasma, en ausencia de sombras de Gümprécht.

El linfoma del manto (antes llamado linfoma centrocítico, linfoma de la zona del manto o linfoma intermedio), es un linfoma indolente.

Las células neoplásicas del linfoma del manto expresan muchos de los marcadores de superficie que expresan las células B de la LLC, incluyendo CD5; sin embargo, a diferencia de la LLC, las células de linfoma del manto no expresan el CD23 y, además, la morfología de las células del manto leucemizado son distintas: linfocitos pequeños con núcleos de contornos irregulares, incluso hendidos y con nucléolo, en ausencia de sombras de Gümprécht.

Tienen una alteración cromosómica característica: la t(11;14).

Linfoma linfocítico de célula pequeña

El linfoma de bajo grado linfocítico de célula pequeña está relacionado con la LLC en su biología y sus características clínicas. Las células neoplásicas del linfoma linfocítico en la sangre son morfológicamente iguales a las células leucémicas de la LLC. Más aún, la histología de los ganglios afectados en la LLC es indistinguible de los del linfoma linfocítico. Además, expresan los mismos marcadores de superficie, incluyendo el CD5. El manejo es similar a la LLC.

Linfoma difuso de células grandes B (LBDCG)

El LBDCG constituye un grupo heterogéneo de linfomas en los que su descripción parte de criterios morfológicos e histológicos. Solo una pequeña proporción de todos los LBDCG (< 5%) presenta infiltración en SP al diagnóstico.

Linfoma Burkitt

El LB es un linfoma B de células grandes, agresivo, que se asocia a estados de inmunodeficiencia grave y cuyo pronóstico se relaciona en gran medida con el grado de extensión de la enfermedad al momento

del diagnóstico. El fenotipo del LB es altamente característico y con frecuencia reproduce los rasgos de los linfocitos grandes centrofoliculares.

Linfoma de la zona marginal esplénico (LZME) y nodal

Clínicamente, el LZME presenta un curso benigno y por lo general los pacientes no requieren tratamiento inmediato. En la SP los linfocitos B neoplásicos son morfológicamente más grandes que las células B normales, tienen un núcleo redondo, algo excéntrico, de contornos regulares, con cromatina condensada, en ocasiones con nucléolo, junto a un citoplasma basófilo con proyecciones vellosas citoplasmáticas, generalmente dispuestas en un polo de la célula (menos numerosas, aunque más gruesas, largas y separadas, que las de las células B de la TL).

Linfoma de la zona marginal extranodal tipo MALT

El linfoma tipo MALT comprende aproximadamente el 7-8% de todos los linfomas de células B y más del 50% de los linfomas gástricos primarios

Linfoma linfoplasmocítico (LLP)

El LLP frecuentemente presenta infiltración de la MO; por el contrario, la presencia de células B clonales en SP es menos habitual en esta entidad. En las muestras infiltradas (tanto en SP como en MO) a menudo coexisten desde linfocitos pequeños clonales hasta linfoplasmocitos típicos y células plasmáticas que expresan el mismo isotipo de cadena ligera de Igs. En la mayoría de los casos se detecta un componente monoclonal, aunque a veces se necesitan métodos sensibles, como la inmunofijación, para su identificación. La macroglobulinemia de Waldenström (MW) es una variante de LLP, caracterizada por la presencia de paraproteinemia IgM (que excede la concentración de 1,5 g/dL) y la acumulación de células linfoplasmocíticas en la MO. En los estadios avanzados de la enfermedad, los pacientes desarrollan organomegalias, anemia e hiperviscosidad sanguínea. La presencia de componente monoclonal IgM diferencia la MW de otras neoplasias con diferenciación plasmocitoide.

SÍNDROMES LINFOPROLIFERATIVOS CRÓNICOS T

Actualmente, el conocimiento acerca de las características fenotípicas de los síndromes linfoproliferativos crónicos T (SLPC-T) es más limitado que el de los SLPC-B, en gran medida por la menor frecuencia de presentación de este grupo de enfermedades y por su mayor complejidad diagnóstica. Por el contrario, a pesar de que las neoplasias de células NK maduras son muy poco frecuentes, su diagnóstico no suele plantear

grandes dificultades, salvo en el caso de las leucemias/linfocitosis clonales de linfocitos grandes granulares de origen NK, debido a la ausencia de marcadores de clonalidad (ausencia de reordenamientos de los genes IGH y TCR), particularmente en el caso de los varones, donde la utilidad de los test moleculares de inactivación del cromosoma X para el diagnóstico de clonalidad es prácticamente nula.

Leucemia de linfocitos grandes granulares (LLGG)

Bajo ese término se incluyen aquellas proliferaciones que se producen a expensas de linfocitos grandes granulares. Pueden tener un origen linfoide T (CD3⁺, TCR β⁺) o un origen NK (CD3⁺, CD56⁺), y su proliferación da lugar a cuadros clinicobiológicos diferenciados. Se trata de leucemias infrecuentes y que constituyen un bajo porcentaje de las leucemias linfoides crónicas.

En la actualidad, se prefiere designar a la antigua leucemia linfocítica crónica T (LLCT) como leucemia linfocítica de gránulos grandes, por sugerencia del grupo de la clasificación MIC (morfológica-inmunológica-citogenética).

Otras características

- γ El curso clínico es muy heterogéneo: algunos pacientes tienen un curso indolente; otros presentan adenopatías leves al igual que hepatoesplenomegalia y son de curso crónico; otros presentan organomegalias prominentes y son curso agresivo. El curso crónico se observa principalmente en línea T y el agudo en células NK.
- γ La mediana de edad son 60 años, sin predominio por sexo.
- γ Un tercio de los pacientes están asintomáticos al diagnóstico y tendrán un curso crónico; en el resto, las manifestaciones clínicas más importantes serán las infecciones por la neutropenia.
- γ Se pueden observar citopenias inmunes, sobre todo neutropenia, aunque también puede haber anemia y trombocitopenia.
- γ El recuento de leucocitos, por lo general, solo es moderadamente incrementado, con linfocitosis absoluta, aunque no siempre aumentada.
- γ En la mayoría de los casos, los linfocitos anormales son muy semejantes a los linfocitos grandes, con gránulos, y tienen las siguientes características: son células más grandes de citoplasma abundante, poco basófilo, con gránulos azurófilos finos o más gruesos, aunque algunas células no los poseen. El núcleo puede ser redondo u ovalado y ligeramente excéntrico, con cromatina en grumos y, por lo general, sin nucléolo. En ocasiones, las células son más grandes y basófilas, con núcleo irregular y a veces con nucléolo.

- γ Para el diagnóstico se requiere la presencia en sangre periférica de LLGG de más de $2 \times 10^9/L$ durante más de seis meses.
- γ Las LLGG tiene un fenotipo maduro postímico; por lo general son CD3⁺, RCT αβ, y en el 80% de los casos CD8⁺.
- γ La MO muestra infiltración de linfocitos semejantes a los de SP en grado variable y es esencial para el diagnóstico en casos sin linfocitosis periférica absoluta.
- γ En la leucemia LGG-NK parece existir una clara implicación del virus del Epstein Barr. Su curso clínico es mucho más agresivo que la LLGG-T, con una edad de presentación más precoz, síntomas B y hepatomegalia. No obstante, los fenómenos inmunes son raros.

Leucemia prolinfocítica T (LPC-T)

En la leucemia prolinfocítica T los prolinfocitos T se caracterizan por presentar un fenotipo T (CD2⁺, CD3⁺, CD5⁺) maduro (ausencia de expresión de CD34, Tdt y CD1a junto a expresión generalmente fuerte de CD45), asociado de forma habitual a una expresión elevada de CD7 y un fenotipo CD4⁺/CD8. Suele cursar con esplenomegalia marcada y altos niveles de leucocitos. La morfología de los prolinfocitos es variable; en cerca del 50% de los pacientes es similar a la de los prolinfocitos B. Puede haber una población menor de prolinfocitos con núcleo polilobulado, semejantes a células de Sézary. En otros casos, las células son pequeñas, con alta relación N/C y nucléolos poco evidentes al microscopio de luz, y con un citoplasma profundamente basófilo. Es posible que en el pasado estos casos se hayan incluido como LLC-T; sin embargo, en exámenes ultraestructurales se observa que tienen un nucléolo prominente, por lo que el grupo FAB los clasifica como LPL-T.

Leucemia/linfoma T del adulto (LLTA)

Es una de las hemopatías más singulares, ya que además de sus peculiares características clínicas, morfológicas y epidemiológicas, fue la primera neoplasia asociada a un retrovirus. Es la única leucemia en que está claramente confirmada su etiología viral, por un virus linfotrópico de células T humanas (HTLV-I), y todos los pacientes presentan anticuerpos séricos contra este virus. La edad media se sitúa en 57 años (35 a 70 años), con una relación idéntica tanto en hombres como en mujeres.

La distribución de la enfermedad está en relación con las áreas donde el virus es endémico. Se descubrió en Japón, pero después se encontró en el Caribe, el sur de EEUU, en el oeste de la India, Suramérica, entre otros.

Manifestaciones clínicas

- γ Pueden ser agudas, en su mayoría, y cursan con adenopatías, hepatoesplenomegalia, lesiones cutáneas, lesiones pulmonares e hipercalcemia, e infecciones por oportunistas. La incidencia de lesiones óseas e infiltración al SNC es baja (< 10%).
- γ Cuadro clínico leve, con signos y síntomas mínimos; cuadro sanguíneo estable y algunos linfocitos leucémicos en SP.
- γ Se han establecido cuatro formas clínicas: aguda (57%), linfomatosa (19%), crónica (19%) e indolente (5%).
- γ El fenotipo de las células leucémicas es CD4⁺.

Características de laboratorio

- γ Ciertos pacientes presentan anemia y otros cursan con neutrofilia y eosinofilia.
- γ Las células varían en forma y tamaño; la mayoría tienen cromatina condensada, pero relativamente homogénea; el nucléolo es infrecuente y pequeño. Se puede observar un bajo porcentaje de blastos. Algunas células tienen núcleo convoluto, semejante a las de Sézary, mientras que muchas son polilobuladas, semejantes a hojas de trébol.
- γ El rasgo biológico más notorio es la asociación con el virus HTLV-1, presente en la práctica en la totalidad de los casos.
- γ Presenta un fenotipo T maduro correspondiente al de un linfocito T regulador CD4⁺/CD25⁺⁺ con expresión de CCR4 y Foxp3; además de la expresión de marcadores pan-T como CD2 y CD5.

Pronóstico

En la forma aguda el curso es agresivo, con una sobrevida menor de un año. Los pacientes que presentan la forma leve o la crónica pueden permanecer estáticos por algunos años, pero finalmente terminan en la fase aguda.

Por lo general, la enfermedad responde en un inicio a la quimioterapia; sin embargo, las remisiones son cortas, al igual que la supervivencia.

Micosis fungoide y síndrome de Sézary

El síndrome de Sézary constituye, junto a la micosis fungoide, la representación genuina de los linfomas cutáneos. Ambos son linfomas T postímicos. Son dos fases de un mismo linfoma, que se debe a una proliferación maligna de linfocitos T cooperadores/inductores, (CD3⁺, CD4⁺ y CD5⁺) que se alojan y multiplican en piel, pero que posteriormente pueden

salir a SP e invadir ganglios y vísceras. La fase inicial es la micosis fungoide, que tiene bajo grado de agresividad y un curso lento y progresivo, con una fase premicótica que dura meses o años. Por lo general, comienza como una dermatitis de contacto o como un eczema o psoriasis crónicas, con lesiones eritematosas, descamativas, intensamente pruriginosas. Conforme progresa la enfermedad, se desarrollan placas infiltrativas; y como etapa final, se producen tumores que invaden la piel totalmente y llegan a necrosarse y ulcerarse (Cuadro N° 5). La biopsia de piel revela la

presencia de células atípicas que forman nidos dentro de la epidermis, constituidas por células mononucleares y linfocitos normales y anormales (células grandes, con núcleos irregulares). El diagnóstico suele establecerse por biopsia de piel. Este estado puede permanecer por meses o años antes de hacerse progresivo. La presencia de linfadenopatías, con compromiso de SP y viceromegalias, incrementa en proporción con el empeoramiento cutáneo, y es signo de mal pronóstico y sobrevida acortada.

Cuadro N° 5. Estadios de la micosis fungoide	
Estadio 1	Parche o placas cutáneos.
Estadio 2A	Parches o placas cutáneos con compromiso de nódulos linfáticos (histológicamente reactiva, no infiltrativa).
Estadio 2B	Tumores cutáneos con o sin compromiso de nódulos linfáticos (histológicamente reactiva si agrandado, no infiltrativa).
Estadio 3	Eritrodermia generalizada con o sin nódulos linfáticos comprometidos (histológicamente reactiva si agrandado, no infiltrativa).
Estadio 4	Nódulos linfáticos histológicamente infiltrados (agrandados o no) o compromiso visceral, incluyendo enfermedad leucémica con eritrodermia (Síndrome de Sézary).

El síndrome de Sézary es una forma avanzada de la micosis fungoide, con infiltración a SP, junto con una eritrodermia exfoliativa o infiltrativa. Las células de Sézary pueden ser grandes o pequeñas, y predomina uno de los dos tipos en cada caso.

- **Células de Sézary grandes:** se parecen en tamaño a un neutrófilo o un monocito; tienen alta relación N/C, con núcleo redondo, altamente convoluto, cromatina densa, con surcos profundos y angostos, semejantes a las circunvalaciones cerebrales; generalmente no tienen nucléolo.
- **Células de Sézary pequeñas:** son del tamaño de linfocitos pequeños, con alta relación N/C y cromatina densa. También presentan surcos y núcleo altamente convoluto; no se observan nucléolos. A veces estas células son difíciles de identificar al microscopio de luz, por lo que resulta muy útil la microscopía electrónica, que evidencia las irregularidades nucleares y el aspecto cerebriforme del núcleo.
- Más del 90% de estas células dan positiva la reacción de la fosfatasa ácida y la beta glucuronidasa. Forman rosetas con eritrocitos de carnero.

Tratamiento

- Las fases iniciales de la enfermedad se tratan con quimioterapia tópica y exposición a luz ultravioleta A.
- La aplicación tópica de una mostaza nitrogenada, revierte las lesiones cutáneas y es particularmente eficaz en estados tempranos de la enfermedad.
- En las formas anatomoclínicas con participación extracutánea debe utilizarse terapia sistémica.

BIBLIOGRAFÍA

- Bain BJ. Leukaemia diagnosis. 2 ed. Oxford: Blackwell Science; 1999. p. 143-157.
- Barrena S, Almeida J, García-Macias MDC, López A, Rasillo A, Sayagués JM, *et al.* Flow cytometry immunophenotyping of fine-needle aspiration specimens: utility in the diagnosis and classification of non-Hodgkin lymphomas. *Histopathology* 2011; 58(6): 906-918.
- Cheson BD, Bennett JM, Grever M, Kay N, Keating MJ, O'Brien S, *et al.* National Cancer Institute-sponsored working group guidelines for chronic lymphocytic leukaemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood* 1996; 87(12): 4990-4997.

Chiorazzi N, Kanti R, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia, mechanisms of disease. *N Eng J Med* 2005; 353(8): 804-815.

Evans L, Hancock B. Non-Hodgkin lymphoma. *Lancet* 2003; 362(9378): 139-146.

Fernández V, Hartmann E, Ott G, Campo E, Rosenwald A. Pathogenesis of mantle-cell lymphoma: all oncogenic roads lead to dysregulation of cell cycle and DNA damage response pathways. *J Clin Onc* 2005; 23(26): 6363-6368.

Hennessy B, Hanrahan E, Daly P. Non-Hodgkin lymphoma: an update. *Lancet Oncol* 2004; 5: 341-352.

Jong D. Molecular pathogenesis of follicular lymphoma: a cross talk of genetic and immunologic factors. *J Clin Onc* 2005; 23(26): 6358-6362.

Ravandi F, O'Brien S. Chronic lymphoid leukemias other than chronic lymphocytic leukemia: diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc* 2005; 80(12): 1660-1674.

Serna J, Monserrat E. Síndromes linfoproliferativos crónicos. *Haematologica* 2005; 90(suppl. 1): 409-424.

Shanafelt TD, Geyer M, Kay NE. Prognosis at diagnosis: integrating molecular biologic Insights into clinical practice for patients with CLL. *Blood* 2004; 103: 1202-1210.

Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, *et al.* WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4 ed. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2008.

Wierda W, Kipps T, Keating M. Novel immune-based treatment strategies for chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Onc* 2005; 23(26): 6325-6332.

Witzig T. Current treatment approaches for mantle-cell lymphoma. *J Clin Onc* 2005; 23(26): 6409-6414.

Zinzani PL, Mazza P, Gherlinzoni F, Zanchini R, Bocchia M, Tiera S. Mycosis fungoides: a therapeutical review. *Haematologica* 1991; 76(2): 150-161.

*Dr. Luis Vásquez Castillo
Dr. Miguel A. Rodríguez Pineda
Dra. Melissa Granados Zamora*

INTRODUCCIÓN

Los principales subgrupos de tumores medulares comprenden: las neoplasias mieloproliferativas, los tumores mieloides/linfoides con eosinofilia y cambios en los genes PDGFRA y PDGFRB y FGFR1, los síndromes mielodisplásicos, los síndromes mielodisplásicos mieloproliferativos y la leucemia aguda no linfocítica. Las neoplasias mieloproliferativas son enfermedades clonales originadas en las células madre hematopoyéticas, en las cuales proliferan una o varias líneas celulares.

William Dameshek, en 1951, fue el primero en mencionar que la policitemia vera, la trombocitemia esencial, la leucemia mieloide crónica y la mielofibrosis primaria eran enfermedades relacionadas entre sí, y las llamó "síndromes mieloproliferativos crónicos". En el año 2008 la Organización Mundial de la Salud (OMS) los denominó como neoplasias mieloproliferativas e incluyó las siguientes entidades: la leucemia mieloide crónica BCR/ABL positivo, la leucemia neutrofílica crónica, la policitemia vera, la mielofibrosis primaria, la trombocitemia esencial, la leucemia eosinofílica sin otra especificación, la mastocitosis y la neoplasia mieloproliferativa no clasificable.

En general, estas enfermedades presentan organomegalias. Además, la morfología de las series eritrocítica y granulocítica son relativamente normales, con hematopoyesis efectiva y maduración de las células. En ellas la médula ósea es muy celular y en la trombocitemia normal. El número de blastos en las fases crónicas suele ser bajo.

Para el diagnóstico de estos padecimientos se requieren: la historia clínica, el estudio citológico e histológico de la médula ósea, estudios citogenéticos convencionales, FISH para BCR/ABL si la citogenética convencional es subóptima y para FLP1L1-PDGFR1 en los casos de eosinofilia. También son necesarios los estudios moleculares para las mutaciones JAK2V617F, la determinación de CALR, JAK2 exón 12, MPL y KITD816V. Aunque el papel de la citometría de flujo no está bien definido, se tiene claro que es útil para determinar la estirpe lineal en los casos de transformaciones.

ALTERACIONES GENÉTICAS

BCR/ABL

Casi todos los pacientes con leucemia mieloide crónica (LMC) tienen anomalías moleculares que involucran a los cromosomas 9 y 22; esto conduce al reordenamiento de los genes ABL y BCR, respectivamente. Cuando se presenta la t(9;22)(q34;q11), conocida como cromosoma Philadelphia (Ph), se da como resultado la formación del gen híbrido BCR/ABL con función tirosina quinasa. La transformación leucémica resultante conduce a una notable expansión de las poblaciones de progenitores eritroides, granulocíticos y megacariocíticos, así como a una disminución de la sensibilidad de los progenitores a la regulación.

JAK-2

Es la kinasa Janus 2. Las mutaciones en esta proteína aumentan la fosforilación por la vía JAK-STAT y con esto se estimula la mielopoyesis independiente de las citoquinas. La mutación más frecuente es la V617F, el cambio de valina por fenilalanina en posición 617; esta mutación es la que se expresa con mayor frecuencia en policitemia vera (96%), en mielofibrosis (65%) y en trombocitemia esencial (55%). Sin embargo, hay otras mutaciones del JAK-2 no relacionadas a V617F que favorecen la eritropoyesis con concentraciones de EPO subnormal y son las PV que se expresan a edades más tempranas.

MPL W515L

Es la alteración donde ocurre una sustitución de triptófano por leucina. Es una mutación que activa el gen de la trombopoyetina. De este gen se han descrito 10 mutaciones en un 10% de la mielofibrosis y en un 3% de la trombocitosis esencial. Este fenotipo se expresa más en pacientes de avanzada, sexo femenino, cifras de hemoglobina baja y trombocitosis.

La expresión de las mutaciones JAK-2 y MPL no afectan la supervivencia ni la transformación leucémica o fibrótica.

LNK

Es una proteína reguladora negativa de la activación de la vía JAK-STAT; se encuentra infrecuentemente en la LMC en fase crónica y en 13% de la fase blástica.

Mutaciones de la calreticulina están ausentes en la policitemia vera y son autoexcluyentes en trombocitosis esencial (TE) y en mielofibrosis. En ambas patologías con JAK-2 y MPL negativos esta mutación puede estar positiva en el 67% de la TE y en el 88% de las mielofibrosis primarias (MFP). Actúa activando la vía del STAT5 con crecimiento independiente de citokinas. Esta mutación fue descrita posterior a la elaboración de los criterios diagnósticos de OMS, por lo cual no están incluidos en dicha versión.

POLICITEMIA VERA

Es una enfermedad clonal crónica de las células madres hematopoyéticas, que se caracteriza por una panmielosis: aumento de la masa eritrocítica, los leucocitos y las plaquetas (el incremento de los eritrocitos es independiente de la hormona reguladora de estos: la eritropoyetina). Aproximadamente el 95% de los casos presenta una mutación del JAK2. Los pacientes con eritrocitosis y JAK2 y gen MPL negativos requieren que se les realice un diagnóstico diferencial con otras eritrocitosis primarias, como las hemoglobinas de alta afinidad por el oxígeno, y secundarias, como EPOC, cardiopatías congénitas y tumores productores de eritropoyetina. En el año 2008, la OMS estableció los criterios de diagnóstico para esta entidad, cuya mediana de aparición se encuentra en la sexta década, aunque un tercio de los enfermos es menor de 50 años.

Cuadro clínico

El cuadro clínico es muy variado e incluye los siguientes síntomas o signos: dolor de cabeza, disnea, visión borrosa, sudoración nocturna, prurito (sobre todo después de un baño caliente) y apariencias pletóricas: cianosis, sufusión conjuntival y esplenomegalia en el 75% de los pacientes.

Las trombosis arterial o venosas son muy frecuentes, pero pueden observarse hemorragias. Un 33% de los pacientes presentan hipertensión arterial y un 5-10% sufren de enfermedad ácido péptica. Hay enfermos que presentan un cuadro de gota.

Criterios diagnósticos

La OMS estableció criterios mayores y menores para el diagnóstico de la policitemia vera. Los criterios

mayores son: hemoglobina superior a 18,5 g x dl en hombres o a 16,5 g x dl en mujeres, y presencia del JAK2v617F u otras mutaciones funcionales y similares; mientras que los criterios menores son: biopsia de médula ósea hiper celular para la edad, con aumento de todas las líneas medulares (panmielosis), niveles de eritropoyetina por debajo del rango normal y formación de colonias eritroides *in vitro*, sin necesidad de eritropoyetina. Para el diagnóstico se requiere de dos criterios mayores y uno menor, o si solo hay aumento de la hemoglobina, la concurrencia de dos criterios menores.

Evolución

La policitemia vera tiene una fase proliferativa que puede durar muchos años; sin embargo, puede virar hacia mielofibrosis o transformarse en una leucemia aguda. La enfermedad puede complicarse con sangrado digestivo alto, ya que se asocia con frecuencia a enfermedad ácido péptica, trombosis arterial y a un síndrome de hiperviscosidad. El pronóstico de la policitemia vera está influenciado por los eventos trombóticos, que son la causa del 45% de las muertes. La mielofibrosis y la leucemia aguda ocasionan la muerte de un 13% de los pacientes.

Laboratorio

El hallazgo principal del hemograma en esta entidad es el aumento de la hemoglobina y el hematocrito. La morfología de los eritrocitos es normal, salvo que se vuelva microcítica e hipocrómica, si se le asocia carencia de hierro por sangrado digestivo o una terapia de sangrías muy agresiva. Hay neutrofilia moderada sin desviación a la izquierda importante y trombocitosis. La médula ósea es hiper celular con aumento de eritroblastos y la serie granulocítica con maduración adecuada. Si la policitemia evoluciona hacia una fibrosis, la morfología de la sangre periférica es similar a la descrita en la mielofibrosis primaria.

Puede haber hiperuricemia y es necesaria la determinación del JAK-2 mutado para el diagnóstico. La cuantificación de la vitamina B₁₂ y la fosfatasa alcalina leucocitaria pueden estar elevadas. Es útil en el diagnóstico diferencial el nivel de eritropoyetina, que debe tomarse antes de las flebotomías.

LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA BCR/ABL POSITIVA

Esta neoplasia mieloproliferativa se origina en una célula madre pluripotencial anormal. Se caracteriza por la gran producción clonal de la serie granulocítica, la cual muestra importante desviación a la izquierda,

pudiendo llegar esta hasta el estadio de blasto. El hallazgo más relevante es la presencia en las células malignas del cromosoma Philadelphia (t:9:22), una translocación que produce un gen funcional anormal en el cromosoma 22 (cromosoma Philadelphia), denominado gen BCR/ABL, que induce la proliferación maligna, la migración y las alteraciones en la adherencia de las células, todo lo cual promueve el desarrollo de la neoplasia. La enfermedad tiene tres fases clínicas, evolutivas: una fase crónica, una fase acelerada y una fase de transformación blástica. El cuadro clínico de esta enfermedad ha cambiado radicalmente desde la introducción de los inhibidores de tirosina quinasa en el arsenal terapéutico hemato-oncológico.

Cuadro clínico

Se presenta fatigabilidad excesiva, pérdida de la sensación de bienestar, disminución de la tolerancia al ejercicio, anorexia, molestias abdominales (asociadas a la esplenomegalia), pérdida de peso y sudoración excesiva. Los síntomas son vagos e inespecíficos y de inicio gradual (semanas a meses). Una exploración física puede detectar palidez y en el 90% de los pacientes esplenomegalia.

Evolución

Lo usual es que esta patología se diagnostique en la fase crónica, la cual se detecta en muchos casos con el paciente asintomático, siendo el hallazgo el resultado de un examen rutinario, que muestra leucocitosis con desviación izquierda sin otra alteración. A medida que la enfermedad progresa aumentan los leucocitos, aparece la anemia y se incrementa el tamaño del bazo. Desde el punto de vista clínico, se caracteriza por un control adecuado de la enfermedad. En la fase acelerada, donde es difícil el tratamiento, la leucocitosis se mantiene o se incrementa, hay trombocitosis que puede superar el millón de plaquetas o puede presentarse trombocitopenia no relacionada con el tratamiento. Además, hay aumento de basófilos y de blastos (estos últimos se incrementan entre un 10% y un 19%, sea en la médula ósea o sangre periférica). También pueden aparecer otras anomalías genéticas aparte del cromosoma Philadelphia. La fase blástica, por su parte, está definida por la OMS por un incremento de blastos igual o mayor a 20% en la médula ósea; estos blastos pueden ser mieloides, monocíticos, linfoides, eritroides o megacariocíticos. Al diagnóstico puede haber fibrosis reticulínica, que en algunos casos puede ser marcada.

Laboratorio

El hemograma en esta enfermedad puede mostrar la presencia de anemia, leucocitosis con desviación a

la izquierda, con picos en la cuenta de neutrófilos y mielocitos, y las plaquetas normales o aumentadas, aunque, como ya se mencionó, en ocasiones pueden estar bajas. Si hay cambios displásicos estos son mínimos. El aumento de basófilos es un hecho casi constante y es posible encontrar eosinofilia y monocitosis discreta. En la fase crónica los blastos no superan por lo general el 5%.

La médula ósea es hipercelular, predominando la serie granulocítica; los megacariocitos son normales o incrementados con hipolobulación; y los basófilos constituyen menos del 20%. Se pueden encontrar histiocitos azul marino o células parecidas a las de Gaucher; en la mayoría de los casos no se observa la presencia de hemosiderina. En la fase acelerada los basófilos pueden superar el 20% y por definición los blastos entre 10-19%. En la fase blástica los blastos superan el 20%.

Fosfatasa alcalina leucocitaria

La fosfatasa alcalina es una enzima encontrada en el citoplasma de neutrófilos, osteoblastos, células endoteliales de los vasos sanguíneos y en algunos linfocitos. Esta enzima está disminuida en el caso de las leucemias mieloides crónicas, al contrario de los aumentos que se observan en las neutrofilias reactivas y en la policitemia vera; en algunos casos de hemoglobinuria paroxismal nocturna y síndromes mielodisplásicos, los valores también pueden ser bajos como en la leucemia granulocítica crónica.

Utilidad

Esta prueba, que es muy utilizada para diferenciar la leucemia mieloide crónica de otras leucocitosis, se ha ido sustituyendo por técnicas de citogenética molecular.

TROMBOCITEMIA ESENCIAL

La trombocitemia esencial es una enfermedad de las células madres, que se caracteriza por un aumento de plaquetas. Fue descrita en 1934 como trombocitemia hemorrágica, ya que la enfermedad tiene una tendencia a presentar complicaciones vasculares, incluyendo trombosis y sangrado. La mayoría de los casos se diagnostican entre la quinta y la sexta década de la vida. La médula ósea muestra una hiperplasia de megacariocitos con poca alteración de las otras series. Entre el 50% y el 60% de los casos son JAK-2 mutados. La enfermedad puede presentar trombocitosis mayor de 450.000, y cuando no presentan mutaciones del JAK-2 se debe descartar la presencia de CALR; si estas son negativas, se deben descartar otras causas reactivas. Es de especial cuidado diferenciar una

trombocitosis cuando hay carencia de hierro, pues la anemia puede ocultar el diagnóstico de policitemia vera.

Diagnóstico

La OMS definió los siguientes criterios de diagnóstico, los cuales deben cumplirse en su totalidad:

1. Aumento sostenido de las plaquetas mayor de $450 \times 10^9/L$.
2. La biopsia de la médula ósea debe mostrar un número aumentado de megacariocitos grandes y maduros sin incremento significativo de los granulocitos, de desviación a la izquierda ni de la eritropoyesis.
3. No cumplir los criterios de OMS para policitemia vera, mielofibrosis primaria, leucemia mieloide crónica, síndromes mielodisplásicos u otras neoplasias mieloides.
4. Demostración de JAK-2 V61F o la mutación MPL W515L/K u otros marcadores clonales; si no las hay, que no haya evidencia de carencia de hierro u otra causa de trombocitosis reactiva.

El diagnóstico diferencial más importante es con la etapa prefibrótica de la mielofibrosis primaria. Como se indicó anteriormente, en los casos negativos para la mutación del JAK-2, se deben descartar causas secundarias de trombocitosis, y si hay carencia de hierro esta se debe tratar y evaluar, descartando la posibilidad de policitemia vera.

Clínica

La principal característica clínica es la trombosis y la hemorragia. La trombosis puede ser arterial o venosa. La hemorragia es el resultado de la disfunción plaquetaria y puede ser crónica o aguda. La mayoría de los casos son asintomáticos y se diagnostican con un hemograma de rutina. Un síntoma característico es la eritromelalgia, la cual se define con una sensación quemante en las plantas o en las palmas y que se alivia rápidamente con el uso de ácido acetil salicílico. Un 40% de los pacientes tienen esplenomegalia palpable, mientras que en otros puede observarse atrofia esplénica producida por infartos.

Evolución

Se considera de curso benigno; su evolución a mielofibrosis es de 4-8% a 10 años. La transformación leucémica es rara y se incrementa con el uso de ciertas terapias citorreductoras. Las principales complicaciones de la enfermedad son los eventos cardiovasculares, asociados a varios factores propios

de la enfermedad: trombocitosis, anormalidades bioquímicas y funcionales de las plaquetas, activación de la coagulación y del endotelio, recuentos altos de leucocitos, activación de leucocitos y plaquetas y mutación del JAK-2.

Laboratorio

El hallazgo fundamental del hemograma es el aumento de plaquetas y no es típico que sean hipogranulares. Los eritrocitos son normales y no es usual ver eritroblastos. Aunque hay leucocitosis, no hay desviación a la izquierda en la mayoría de los casos, tampoco eosinofilia o basofilia o esta es mínima. Pueden observarse micromegacariocitos o fragmentos de núcleo de estos circulando.

La médula ósea tiene hiperplasia de megacariocitos, grandes, maduros y uniformes e hiperlobulados; se puede observar el fenómeno de emperipolesis; las otras series medulares son normales.

mieLOFIBROSIS PRIMARIA

La mielofibrosis primaria es una neoplasia mieloproliferativa Ph-, caracterizada por proliferación medular aumentada con dismielopoiesis, megacariocitos hipolobulados, fibrosis medular y citopenias. Este cuadro debe diferenciarse de las mielofibrosis secundarias y de otras neoplasias mieloproliferativas, especialmente la policitemia vera, la leucemia mieloide crónica y la trombocitemia esencial; de hecho, se han definido criterios para su correcta identificación. Otro aspecto importante de la mielofibrosis primaria es la diferenciación de la fase proliferativa inicial de la enfermedad con una etapa inicial prefibrótica de la trombocitemia esencial, entidades en las cuales se ha señalado un pronóstico diferente. En esta enfermedad se ha detectado la presencia del JAK2V617F en el 60% de los casos y mutación en MPL en 5-10%, así como otras mutaciones menos frecuentes. Las causas de muerte en esta enfermedad son: leucemia (31%), aceleración de la enfermedad con o sin transformación leucémica (19%), trombosis (14%), sangrado (5%), infección (10%), hipertensión portal (4%), segunda neoplasia (4%) y otras causas (10%). La fibrosis medular puede ser secundaria a otras enfermedades como el linfoma de Hodgkin y el lupus eritematoso sistémico.

Criterios de diagnóstico

La Organización Mundial de la Salud (OMS) fijó criterios de diagnóstico mayores y menores. Los criterios menores son: cuadro leucoeritroblástico, incremento de la DHL, anemia y esplenomegalia; mientras que los

mayores son:

- 1- Proliferación de megacariocitos con atípia, generalmente acompañada por fibras de reticulina y/o colágeno. En ausencia de fibrosis o si esta es mínima, los megacariocitos deben ir asociados a una médula ósea hipercelular, con aumento de granulocitos y usualmente con disminución de la eritropoyesis (fase celular pre fibrótica).
- 2- Ausencia de criterios de policitemia vera, leucemia mielocítica crónica BCR/ABL+, síndromes mielodisplásicos u otras enfermedades mieloides.
- 3- Demostración de JAK2V617F u otro marcador clonal; en ausencia de marcadores clonales, que no haya evidencia de cambios secundarios a infección, trastornos autoinmunes, condición inflamatoria crónica, leucemia de células peludas y otras neoplasias linfoides, tumor metastásico o mielopatías tóxicas.

El diagnóstico de mielofibrosis requiere tres criterios mayores y dos menores. Además, es necesario tomar en cuenta que los megacariocitos son variables en su tamaño, con núcleos con imagen de cuernos de asta, hipercromáticos bulbosos, irregulares de núcleos plegados y agrupados; algunos autores hacen la descripción de los núcleos como en forma de astas de ciervo.

Clínica

Se caracteriza por fatiga (84%), dolor óseo (47%), anemia, leucoeritroblastosis, molestias digestivas inducidas por la esplenomegalia gigante (hemopoyesis extramedular), y síntomas constitucionales: sudoración nocturna (56%), prurito (50%) y fiebre (18%).

Laboratorio

En la fase prefibrótica de la enfermedad, las plaquetas pueden estar elevadas (simulando la trombocitemia esencial), ser de gran tamaño y agranulares. Si hay anemia esta es de grado discreto, los leucocitos normales o con leve aumento, pudiendo existir basofilia, y los blastos no superan el 2%. La médula ósea se encuentra como se mencionó en el punto uno de los criterios de diagnóstico mayores. En la fase fibrótica hay trombocitopenia y megacariocitos circulantes, se incrementa el descenso de la hemoglobina y hay eritroblastos circulantes y leucocitosis; puede aparecer desviación a la izquierda. Puede coexistir eosinofilia y basofilia, lo mismo que la presencia de blastos, pero que no superan por la general el 5%. En esta etapa el aspirado de la médula ósea es infructuoso y la biopsia muestra la presencia de fibrosis y megacariocitos anormales; también se pueden observar nódulos

linfoides hasta en un 25% de los pacientes.

SÍNDROME HIPEREOSINOFÍLICO

Según el criterio de la OMS, las neoplasias mieloproliferativas incluyen la leucemia eosinofílica crónica, sin otra especificación, las neoplasias mieloides y linfoides con eosinofilia y anormalidades de los genes PDGFRA, PDGFRB o FGFR1.

Los criterios de la OMS para la leucemia eosinofílica crónica (a la cual no se recomienda llamar "síndrome eosinofílico crónico") son: eosinofilia mayor de $1,5 \times 10^9$ L, inexistencia de indicios que indiquen presencia del cromosoma Philadelphia o gen de fusión BCR-ABL o de otras neoplasias mieloproliferativas o mielodisplásicas/mieloproliferativas. Ausencia de t(5;12)q31-35;p13 u otros arreglos del PDGFR, así como de fusión de los genes FIP1L1-PDGFR y rearrreglos del FGFR1. Además, la cuenta de blastos en la sangre periférica o en la médula ósea debe ser menor a 20% y sin inv(16) (p13.1;q22) u otros criterios de leucemia aguda no linfocítica. Una eosinofilia en ausencia de estos criterios puede ser reactiva o corresponder a un síndrome mieloproliferativo idiopático.

Patogenia

La etiología es neoplásica, pero debe involucrar una desregulación en las citoquinas esenciales en el proceso de maduración del eosinófilo.

Los eosinófilos poseen una citotoxicidad directa sobre los tejidos al liberar elementos tóxicos, entre ellos especies reactivas de oxígeno, diferentes enzimas, citoquinas proinflamatorias y factores derivados del ácido araquidónico.

Signos y síntomas

La clínica es altamente variable, así como el pronóstico. Los síntomas son bastante inespecíficos, entre ellos fatiga, cansancio, rash, fiebre y diarrea.

El diagnóstico es de exclusión, y se deben cumplir los siguientes criterios:

1. Eosinofilia en sangre periférica mayor a $1500/\mu\text{L}$ por más de seis meses con signos y síntomas de enfermedad hipereosinofílica.
2. Ausencia de la causa de la hipereosinofilia (por ejemplo, parásitos, alergias, reacciones adversas a medicamentos).
3. Daño orgánico o disfunción debido a la liberación de elementos tóxicos por parte de los eosinófilos.

Es esencial diferenciar el síndrome hipereosinofílico de la leucemia eosinofílica crónica. En esta última los pacientes presentan aumento de mieloblastos en médula ósea y/o sangre periférica, sin alcanzar el 20%, además de anemia, esplenomegalia y trombocitopenia. Sin embargo, son dos entidades difíciles de distinguir.

Hallazgos de laboratorio

Lo primero a evaluar es el valor aumentado y sostenido de eosinófilos por encima de 1500/uL. Además, siendo un diagnóstico de exclusión, es importante evaluar niveles de vitamina B₁₂, IgE sérica, médula ósea y el hemograma completo.

Pronóstico y tratamiento

Se ha logrado aumentar la sobrevida al 80% a los cinco años, gracias a los avances en el tratamiento; no obstante, sigue siendo una entidad difícil de tratar. Las estrategias buscan disminuir el conteo eosinofílico en circulación, con el fin de disminuir el daño a los órganos.

En los casos de eosinofilia asociadas a anormalidades de los linfocitos, los corticoesteroides son la primera línea de tratamiento, con el fin de disminuir el conteo total de eosinófilos. También, se utilizan agentes citotóxicos como la hidroxiaurea y cuando hay anormalidades genéticas los inhibidores de tirosin quinasa. Lo más novedoso es la terapia con anticuerpos monoclonales, entre ellos mepolixumab, cuyo blanco es la IL-5, una de las citoquinas específicas en la maduración del eosinófilo.

MASTOCITOSIS PRIMARIA

Patogenia

La mastocitosis se define como una acumulación anormal de mastocitos en uno o más órganos, debido a una proliferación clonal de estas células. Se clasifica en mastocitosis cutánea y mastocitosis sistémica, siendo la primera la principal encontrada en niños y es de desarrollo benigno, mientras que la segunda se presenta sobre todo en adultos y su pronóstico suele ser más reservado.

La mutación D816V en el gen c-KIT afecta el sitio catalítico de KIT y ha sido aceptada como la causante de esta enfermedad. KIT se trata del receptor del factor de crecimiento SCF (*stem cell factor*) y posee actividad tirosin quinasa. Este receptor se expresa en diferentes líneas celulares, como mastocitos, células progenitoras hematopoyéticas, melanocitos, y células germinales. Al existir una mutación en el receptor KIT,

este se torna altamente activo y deja de depender del estímulo de SCF.

Se han identificado nuevas mutaciones en el gen c-KIT que podrían desempeñar un rol en la etiología de esta enfermedad, entre estas V560G, D816Y, D816F y D816H.

Diagnóstico

El marcador principal es el acúmulo de mastocitos en piel, si se trata de la variedad cutánea, o en órganos viscerales, si se trata de la sistémica. En la primera se observan las lesiones cutáneas típicas y en la biopsia de piel el acúmulo de los mastocitos. En la segunda variedad el diagnóstico se realiza a través de biopsia de médula ósea. Según la OMS, debe cumplirse el criterio mayor y un criterio menor, o los tres criterios menores a continuación mencionados, para llegar al diagnóstico de mastocitosis sistémica:

- γ Criterio mayor: infiltrados densos multifocales de mastocitos (más de 15 en cada agregado) en biopsia de la médula ósea o de cualquier órgano extracutáneo, con tinción de triptasa.
- γ Criterio menor:
 1. En biopsia de médula ósea o de cualquier órgano extracutáneo, más del 25% de los mastocitos muestran morfología anormal en lesiones multifocales.
 2. Detección de una mutación puntual D816V en el gen del receptor KIT.
 3. Mastocitos KIT-positivos en médula ósea, sangre u otros órganos internos, que además expresen CD2 y/o CD25.
 4. Niveles séricos de triptasa total mayores a 20 ng/ml. Sin embargo, este criterio queda excluido si el paciente presenta un desorden hematológico clonal no asociado a mastocitos.

Signos y síntomas

En la mastocitosis cutánea los pacientes muestran lesiones cutáneas, siendo la urticaria pigmentosa la manifestación cutánea más típica y más frecuente de esta enfermedad. Las lesiones son máculas de pequeño tamaño, de color amarillento-rojizo. Con menor frecuencia, pueden ser nodulares. Otra forma frecuente de mastocitosis cutánea es la mastocitosis cutánea difusa, que afecta a todo el espesor de la piel, lo que produce un engrosamiento de esta. Pueden presentar erupciones y bullas con hemorragias asociadas.

En la mastocitosis sistémica se ha identificado el bazo, la médula ósea, el hígado y los nódulos linfáticos como los sitios más comunes infiltrados por mastocitos. La biopsia de médula ósea es la muestra ideal para realizar el diagnóstico, observando los acúmulos de mastocitos, en conjunto con el análisis de inmunohistoquímica y citometría de flujo. La mastocitosis pasa a ser definida como leucemia de mastocitos si hay más del 20% de mastocitos en médula ósea.

Pronóstico

Según se haya clasificado el tipo de mastocitosis, así será el pronóstico del paciente. Si se trata del tipo cutáneo o indolente, el pronóstico es bueno y su sobrevida será normal. Si se trata de una mastocitosis agresiva, el paciente enfrenta un pronóstico reservado,

ya que su sobrevida depende de los cuidados que se le den y de su respuesta al tratamiento citoreductor. En la leucemia de mastocitos el pronóstico es malo, con una sobrevida de meses a un año.

Tratamiento

El tratamiento depende de los síntomas y de la clasificación que se le haya dado a la enfermedad. El propósito principal es controlar los síntomas e inhibir los mediadores derivados de estos mastocitos, especialmente las histaminas y los leucotrienos. Se utilizan antihistamínicos, inhibidores de leucotrienos, inhibidores de la bomba de protones, antiinflamatorios no esteroideos y agentes citoreductores; este último se reserva para los casos más agresivos.

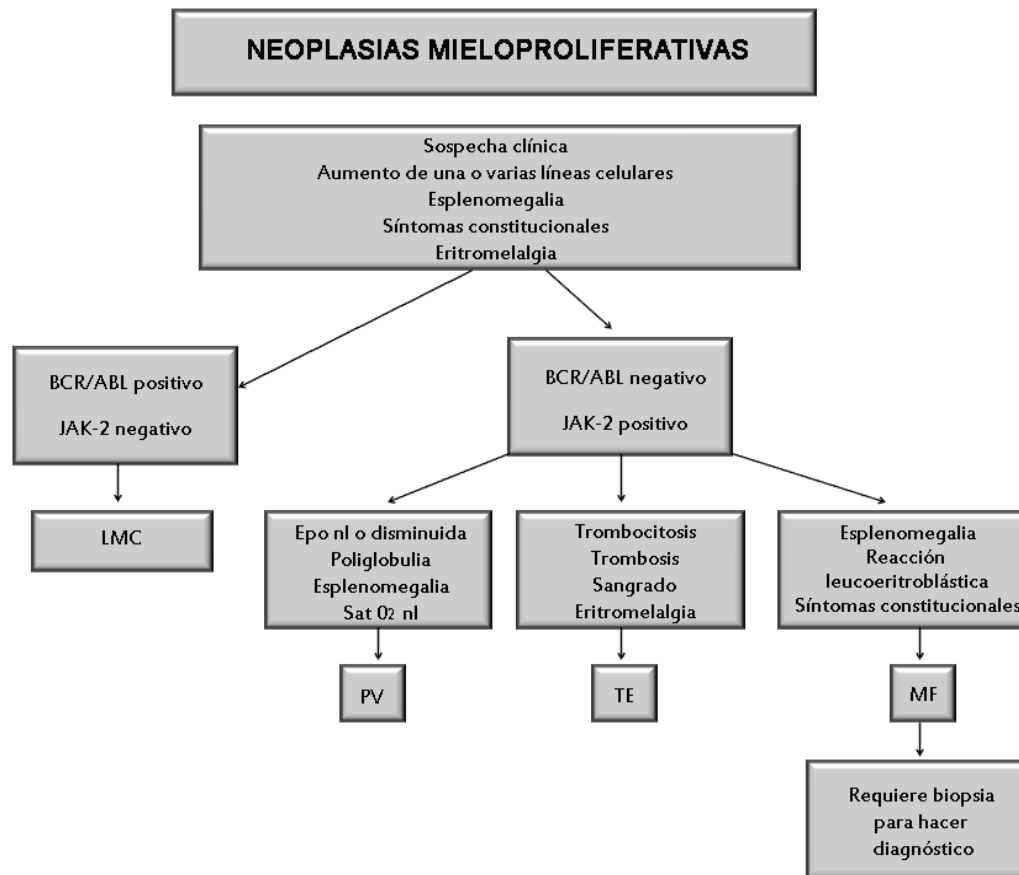


Figura N° 1. Diagnóstico neoplasias mieloproliferativas.

BIBLIOGRAFÍA

Bain B, Gilliland D, Vardiman J, Horny H. Chronic eosinophilic leukaemia. En: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, *et al.* WHO classification of tumours of hematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: International agency for research on cancer; 2008. p. 51-63.

Bain B. Blood cells: a practical guide. 4 ed. Massachusetts: Blackwell Publishing; 2006. p. 263-270.

Castells MC. Mast cells mediators in allergic inflammation and mastocytosis. *Immunol Allergy Clin North Am* 2006; 26(3): 465-485.

Gleich G, Leiferman K. The hypereosinophilic syndromes: current concepts and treatments. *Br J Haematol* 2009; 145(3): 271-285.

Jiménez-Arce G, Carrillo Juan, Chaves M, Jiménez R, Vargas M, Campos L, *et al.* Detección molecular del gen BCR-ABL por RT-PCR en niños costarricenses con leucemia. *Rev Biol Trop* 2008; 56(4): 1613-1618.

Klion A. Hypereosinophilic syndrome: current approach to diagnosis and treatment. *Annu Rev Med* 2009; 60: 293-306.

Metcalf D. Mast cells and mastocytosis. *Blood* 2008; 112(4): 946-956.

Perkins S. Examination of the blood and bone marrow. En: Greer J, Foerster J, Lukens J (editores) *Wintrobe's Clinical Hematology*. 11 ed. New York: Lippincott Williams and Wilkins; 2004.

Shinton NK. Desk reference for hematology. 2 ed. Florida: CRC Press; 2008. p. 667-668

Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, *et al.* WHO Classification of tumours of hematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: International agency for research on cancer; 2008.

Vainchenker W, Delhommeau F, Constantinescu S, Bernard O. New mutations and pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2011; 118(7): 1723-1735.

Vakil E, Tefferi A. BCR-ABL1--negative myeloproliferative neoplasms: a review of molecular biology, diagnosis, and treatment. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2011; 11(Suppl. 1): S37-S45.

Valent P. Diagnostic evaluation and classification of mastocytosis. *Immunol Allergy Clin North Am* 2006; 26(3): 515-534.

Wadleigh M, Tefferi A. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms according to the 2008 World Health Organization criteria. *Int J Hematol* 2010; 91: 174-179.

Wilkins H, Crane M, Copeland K, Williams W. Hypereosinophilic syndrome: an update. *Am J Hematol* 2005; 80(2): 148-157.

*Dra. María Rodríguez Sevilla
Dr. German F. Sáenz Renauld
Dr. Willem Buján Boza*

INTRODUCCIÓN

Los síndromes mielodisplásicos son un grupo estrechamente relacionado de desórdenes adquiridos de la hemopoyesis, que se caracterizan por presentar hemopoyesis ineficaz, displásica, con tendencia incrementada a transformarse en leucemia aguda, de pobre pronóstico. Estos síndromes, llamados también preleucémicos, se caracterizan por una mutación clonal y, por tanto, sus defectos se observan en todas las líneas celulares.

ETIOLOGÍA DE LOS SÍNDROMES MIELODISPLÁSICOS (SMD)

La etiología de los SMD es todavía desconocida, aunque se han identificado algunos factores ambientales:

- γ El benceno y sus derivados.
- γ Pesticidas.
- γ Algunos solventes orgánicos o derivados amoniacales.
- γ Determinados fármacos, como agentes alquilantes y las radiaciones ionizantes: los tratamientos con quimioterapia y radioterapia incrementan el riesgo de aparición de estas patologías.

Con base en la etiología, los SMD se dividen en:

- γ Primarios (con historia negativa de exposición a tóxicos, quimio o radioterapia).
- γ Secundarios a quimioterapia, radioterapia, etc. En esta categoría se incluyen pacientes sometidos a terapia por otros tumores con mayor probabilidad de desarrollar la mielodisplasia. Entre las drogas asociadas se encuentran: melfalán, clorambucil, busulfán, nitrosureas y ciclofosfamida.

Esta clasificación etiológica reviste particular importancia, ya que los SMD secundarios suelen tener un pronóstico más pobre que los de novo. El pronóstico se relaciona directamente con el número de blastos en médula ósea (MO) y el grado de citopenias en sangre periférica (SP).

PATOBIOLOGÍA

Los SMD son enfermedades neoplásicas que se producen como consecuencia de una mutación a nivel de la UFC-GEMM o, menos frecuentemente, de la UFC-LM, como se ha confirmado por estudios citogenéticos y de análisis de oncogenes. Se sabe que diversos agentes mutágenos (fármacos, virus, radiaciones), a través de mecanismos de reordenamiento cromosómico, pueden transformar una célula madre en displásica.

Un hallazgo casi general de todos los SMD es el encontrar una MO hiper celular con citopenias periféricas. Esta discrepancia se atribuye a un incremento en la apoptosis (muerte celular programada) de las células de la MO, lo que origina las citopenias periféricas. La apoptosis incluye daño genético esencial y perturbación del microambiente inductor medular. Un 10% puede cursar con médulas hipocelulares.

El desarrollo de la mielodisplasia ocurre a través de múltiples estadios evolutivos. El inicio común es la emergencia de una clona celular hemopoyética alterada, caracterizada por displasia, disfunción celular y una ventaja proliferativa. El daño inicial en la célula madre promueve inestabilidad genómica e incrementa la posibilidad de otros daños adicionales. En general, aunque la etiología de los SMD no está bien definida, se sabe que participan los siguientes mecanismos:

- γ Daño en el ADN somático.
- γ Defectuosa reparación del ADN.
- γ Sobrevida inmunológica alterada.
- γ Desregulación en la transducción de señales.

ASPECTOS CLÍNICOS

Son muy característicos, aunque no exclusivos, de personas adultas mayores. El 50% de los casos se presenta en personas mayores de 60 años y el 50% restante en mayores de 50 años. Se caracterizan por un cuadro anémico que no responde a los tratamientos clásicos, con una o más citopenias crónicas. En algu-

nos casos puede, sin embargo, presentarse monocitosis o neutrofilia, al igual que trombocitosis. La presencia de hepatoesplenomegalia es un hallazgo raro, con excepción de la leucemia mielomonocítica crónica (LMMC). Dependiendo de la serie celular defectuosa, estos pacientes pueden tener púrpuras trombocitopénicas o una mayor susceptibilidad a infecciones, producto de la neutropenia.

CLASIFICACIÓN

La más usada en la actualidad es la de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Cuadro N° 1). La clasificación clásica del grupo FAB (Francés-Americano-Británico) fue muy utilizada por más de 15 años (Cuadro N° 2); sin embargo, la necesidad de incluir nuevos cuadros y de una caracterización pronóstica, así como los hallazgos citogenéticos o moleculares y el hecho de que la LMMC presenta características distintas, han llevado a revisar esta clasificación.

Cuadro N° 1. Clasificación del SMD según la OMS		
Subtipo	Hemograma	Médula ósea
Anemia refractaria (AR)	Anemia; sin o escasos blastos.	Solo displasia eritroide; < 5% blastos; < 15% sideroblastos.
Citopenia refractaria con displasia de varias líneas celulares	Citopenia (bicitopenia o pancitopenia); sin o escasos blastos; no bastones de Auer; < 1 x 10 ⁹ /L monocitos.	Displasia en ≥ 10% de las células, en ≥ 2 líneas celulares mieloides; < 5% blastos; no bastones de Auer; < 15% sideroblastos en anillo.
Anemia refractaria con sideroblastos en anillo (ARSA)	Anemia; sin blastos.	Solo displasia eritroide; < 5% blastos; ≥ 15% sideroblastos en anillo.
Citopenia refractaria con displasia de múltiples líneas celulares y sideroblastos en anillo	Citopenias (bicitopenia o pancitopenia); sin o escasos blastos; no bastones de Auer; < 1 x 10 ⁹ /L monocitos.	Displasia en ≥ 10% de las células, en ≥ 2 líneas celulares mieloides; < 5% blastos; no bastones de Auer; ≥ 15% sideroblastos en anillo.
Anemia refractaria con exceso de blastos-1 (AREB-1)	Citopenias; < 5% blastos; no bastones de Auer; < 1 x 10 ⁹ /L monocitos	Displasia de una o múltiples líneas celulares; 5% a 9% de blastos; no bastones de Auer.
Anemia refractaria con exceso de blastos-2 (AREB-2)	Citopenias; > 5% a 19% blastos; no bastones de Auer ±, < 1 x 10 ⁹ /L monocitos	Displasia de una o múltiples líneas celulares; 10% a 19% de blastos; cuerpos de Auer ausentes o presentes.
Síndrome mielodisplásico no clasificado (SMD-NC)	Citopenias; pocos blastos o ninguno; no bastones de Auer.	Displasia de una línea celular; < 5% blastos; no bastones de Auer.
SMD asociado con delección aislada (5q)	Anemia; < 5% blastos; plaquetas normales o aumentadas.	Megacariocitos normales o aumentados con núcleos hipolobulados; 5% blastos; no bastones de Auer; del aislada (5q).

Cuadro N° 2. Clasificación del SMD según la FAB		
Subtipo FAB	% blastos en sangre periférica	% blastos en médula ósea
Anemia refractaria (AR)	< 1	< 5
Anemia refractaria con sideroblastos en anillo (ARSA)	< 1	< 5
Anemia refractaria con exceso de blastos (AREB)	< 5	5-20
Anemia refractaria con exceso de blastos en transformación (AREB-t)	> 5	21-30
Leucemia mielomonocítica crónica (> 1.000 monocitos/ μ L de sangre)	> 5	5-20

Clasificación FAB

Se basa principalmente en los criterios morfológicos de la MO y del frotis sanguíneo. El límite con leucemia aguda es 30% de blastos medulares. También es parámetro fundamental el porcentaje de blastos en MO y SP. La monocitosis periférica, la presencia de cuerpos de Auer y sideroblastos anulares también son criterios considerados en esta clasificación. Los sideroblastos anulares son eritroblastos que presentan numerosos gránulos azules alrededor del núcleo, en forma de corona concéntrica, cuando se practica la tinción de hemosiderina a la MO. Los eritroblastos normales, por su parte, poseen solo de uno a dos gránulos de hierro.

El grupo FAB divide los SMD en cinco grupos:

1. Anemia refractaria.
2. Anemia refractaria con sideroblastos anulares.
3. Anemia refractaria con exceso de blastos.
4. Anemia refractaria con exceso de blastos en transformación.
5. Leucemia mielomonocítica crónica.

Anemia refractaria (AR)

La AR constituye del 30% al 40% de los SMD y presenta:

- γ Anemia aislada con reticulocitopenia, comúnmente macrocítica, aunque por lo general sin macrocitos ovoides; en ocasiones es normocítica.
- γ MO hipercelular, con hiperplasia eritroide y diseritropoyesis; a veces la MO es hipocelular.
- γ Anormalidades escasas de serie granulocítica y trombocítica.
- γ Ocasionalmente, puede haber disgranulopoyesis o

distrombopoyesis.

- γ < 5% de blastos en MO y ausencia de blastos circulantes.
- γ < 1% de blastos en circulación.
- γ < 15% de sideroblastos anulares.
- γ Hepato o esplenomegalia en una minoría de casos.
- γ Evolución leucémica en el 20% de los casos.
- γ Sobrevida media de 3-4 años.

Anemia refractaria con sideroblastos anulares (ARS) o anemia sideroblástica idiopática

Constituye del 15-25% de los SMD y suele cursar con:

- γ Anemia macrocítica; en ocasiones es normocítica o microcítica.
- γ El frotis de SP suele ser dimórfico, con una población predominante de macrocitos normocrómicos y una población menor de microcitos hipocrómicos. A veces se observa punteado basófilo. Los eritrocitos hipocrómicos pueden mostrar cuerpos de Pappenheimer. A menudo se observa un escaso número de eritroblastos en los que se pueden notar defectos de hemoglobinización.
- γ El VCM es normal o alto, aunque en ocasiones es bajo.
- γ FeS alto; saturación de la transferrina elevada; ferritina sérica elevada.
- γ Algunos pacientes presentan neutropenia y trombocitopenia con cambios displásicos, pero a menudo estas líneas celulares son normales, morfológica y cuantitativamente.
- γ < 1% de blastos en SP.
- γ MO generalmente hipercelular, a base de eritroblastos diseritropoyéticos, que muestran defectos de hemoglobinización. Presencia de > 15% de sideroblastos anulares y < 5% de blastos en la médula.

- γ Curso clínico benigno con supervivencia media sobre los 10 años.
- γ Evolución a leucemia aguda (LA) en el 10% de los casos.

El Fe de los sideroblastos anulares está en las mitocondrias, mientras que el normal se encuentra en el citoplasma. Actualmente, el grupo FAB sugiere que el recuento de sideroblastos anulares se cuente como porcentaje de todas las células nucleadas de MO, en lugar de hacerlo como porcentaje de los eritroblastos.

Anemia refractaria con exceso de blastos (AREB)

Constituye del 15 al 25% de los SMD y se caracteriza por:

- γ Anemia normo-macroscítica asociada a leuco y trombocitopenia.
- γ Los pacientes pueden mostrar los cambios de serie roja descritos en AR y ARSA.
- γ La disgranulopoyesis y la distrombopoyesis son más frecuentes que en AR y ARSA.
- γ Blastos en MO entre 5% y 20%, con < 5% de blastos en SP.
- γ MO hiper celular con displasia trilinear.
- γ Los sideroblastos anulares pueden estar presentes y exceder el 15% de los eritroblastos (clasificación antigua).
- γ Frecuentes anormalidades citogenéticas. Supervivencia media 12-20 meses.
- γ Una buena parte termina en LA, mientras que los otros pacientes mueren por fallo medular debido a complicaciones hemorrágicas o infecciones.

Anemia refractaria con exceso de blastos en transformación (AREB-t)

Constituye del 5% al 10% de los SMD. Los pacientes con AREB-t suelen presentar:

- γ Infecciones y hemorragias, además de anemia.
- γ Hepato y esplenomegalia.
- γ > 5% de blastos en SP (con cuerpos de Auer) y entre 20-30% de blastos en MO.
- γ Es usual la displasia de las tres líneas celulares.

Leucemia mielomonocítica crónica (LMMC)

Constituye el 15% de los SMD y cursa con los siguientes hechos:

- γ Monocitosis absoluta (> 1.000 monocitos/ul).
- γ Anemia asociada a leucocitosis y trombocitopenia.
- γ Frecuente hepatoesplenomegalia.
- γ MO hiper celular. Los promonocitos son prominen-

tes con relativamente pocos monocitos maduros. En ocasiones hay una marcada hiperplasia granulocítica, con precursores monocíticos inconspicuos. Los sideroblastos anulares pueden ser > 15% de las células eritroides.

- γ Blastos medulares entre 5-20%, con presencia de monoblastos y < 5% de blastos en SP.
- γ Supervivencia media de 12-24 meses.
- γ Riesgo de evolución a LA, como en AREB.
- γ Muramidasa sérica y urinaria elevadas; la última puede producir fallo renal.
- γ Disfunción inmunológica frecuente; cerca del 50% de los pacientes presentan autoanticuerpos, muchos de los cuales son aglutininas frías; 10% dan la prueba de Coombs positiva y muestran esferocitos en el frotis de SP.
- γ A veces los monocitos son de morfología muy aberrante, con núcleo hipersegmentado, con características de inmadurez como aumento de la basofilia citoplasmática, con gránulos azurófilos prominentes. Se pueden encontrar promonocitos, pero es raro ver monoblastos.
- γ Puede haber anemia, por lo general normocítica normocrómica. También se puede presentar macrocitosis y, en ocasiones, microcitos hipocrómicos en pacientes con eritropoyesis sideroblástica.

En cuanto a la clasificación de la OMS, esta reclasifica a la LMMC como una entidad aparte, denominada "enfermedades mielodisplásicas/mieloproliferativas", en la cual se estableció lo siguiente:

- Eliminación de la AREB-t.
- Establecimiento del 20% de blastos en MO como límite entre SMD y leucemia aguda.
- Inclusión de información citogenética (Síndrome 5q-).
- Introducción de una nueva categoría (citopenias refractarias con displasia multilineal). Este subgrupo incluye casos de citopenias y displasias que no cumplen con el requisito mínimo de blastos para ser una AREB, y que es un grupo intermedio entre esta y la AR, ARS.
- División de la AREB en dos subtipos.

Esta clasificación de la OMS es la que se utiliza a nivel mundial, aunque también se toma en cuenta a la del FAB por ser la clásica. Se recalca principalmente el hecho de que en la de la OMS la barrera entre mielodisplasia y leucemia aguda es de 20% de blastos en MO, y que se elimina la categoría de AREB-t.

Clasificación pronóstica (IPSS)

Desde 1982 se han realizado algunos intentos para evaluar los SMD desde un punto de vista de evolución

clínica. En 1997 se conformó un Grupo Internacional de Trabajo para el Análisis del Riesgo en Mielodisplasia y como producto se estableció el Sistema Internacional de Puntaje Pronóstico (*International Prognostic Scoring System*, IPSS). Este sistema combina hallazgos

citogenéticos, morfológicos y clínicos para valorar la evolución de los pacientes con mielodisplasia (Cuadro N° 3). En resumen, entre menos blastos se detecten en MO, menos citopenias tenga el cuadro y los cariotipos sean benignos, el pronóstico será más favorable.

Cuadro N° 3. Puntuación según el Sistema Internacional de Puntaje Pronóstico (IPSS)					
Supervivencia y evolución a LMA					
	Valor de puntuación				
Variable pronóstica	0	0,5	1,0	1,5	2,0
Blastos medulares (%)**	< 5	5-10	-	11-20	21-30
Cariotipo***	Bueno	Intermedio	Desfavorable		
Citopenias****	0/1	2/3			

** Los pacientes con 21-30% de blastos pueden ser diagnosticados de SMD o LMA.

*** Citogénética: buena = normal, del (5q) o del (20q); desfavorable = compleja (≥ 3 anomalías o anomalías del cromosoma 7); intermedia = otras anomalías. (Excluye los cariotipos t(8:21), inv 16 y t(15:17), que son considerados LMA y no SMD).

**** Citopenias: definida por recuento de neutrófilos $< 1.800/\mu\text{l}$, plaquetas $< 100.000/\mu\text{l}$ y Hb $< 10 \text{ g/dl}$.

Diagnóstico diferencial de la mielodisplasia

Es necesario diferenciar la LMMC de la leucemia granulocítica crónica (LGC), aunque en el caso de la LCG Ph1+ no es difícil, pues el cuadro de SP es muy característico y las alteraciones displásicas antes de entrar a la fase blástica son pocas. Diferenciar la LMMC de la LGC Ph1- es más complicado, y por tanto, esto se discute con mayor profundidad en el capítulo 22 "Síndromes mieloproliferativos".

Por otra parte, en el diagnóstico diferencial de los SMD citopénicos se deben considerar otras condiciones, como anemia aplásica, hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN), y leucemia aguda.

ALTERACIONES MORFOLÓGICAS

Se ha demostrado que la mielodisplasia se asocia con un daño en la maduración celular, debido a defectos intrínsecos de las células del clono neoplásico, y este daño constituye el mecanismo fisiopatológico fundamental de estos padecimientos. En los SMD las células hemopoyéticas presentan alteraciones morfológicas tanto a nivel de MO como de sangre periférica, las cuales constituyen el paso preliminar en el diagnóstico de dichas enfermedades. Para que en efecto se pueda pensar en una displasia, es necesario

que al menos 10% de los elementos medulares o periféricos presenten anomalías típicas (Cuadro N° 4). Ciertas anormalidades como el Pelger-Huet adquirido o los micromegacariocitos son altamente característicos y casi patognomónicos de los SMD, y algunas de esas anormalidades se observan en alto porcentaje en estos pacientes; los neutrófilos agranulares (hialinos) son también altamente específicos, pero están presentes en una baja proporción de pacientes. La monocitosis, la macrocitosis y la neutropenia son menos específicas y requieren diagnóstico diferencial.

Alteraciones funcionales

La eritropoyesis es ineficaz; puede presentarse deficiencia en varias enzimas glicolíticas, entre ellas la piruvato quinasa; niveles aumentados de HbF; y enfermedad por HbH de tipo adquirida. Los granulocitos muestran déficit de mieloperoxidasa y reducida capacidad migratoria, fagocítica y antimicrobiana. En las plaquetas hay defectos en la adhesividad y agregación; tromboxano A2 disminuido.

Cuadro N° 4. Anormalidades citomorfológicas en los SMD		
Tipo de desorden	Médula ósea	Sangre periférica
Diseritropoyesis	•γ Hiperplasia eritroblástica. •γ Aspecto megaloblástico. •γ Núcleo en "palomita de maíz" o en forma de trébol. •γ Multinuclearidad. •γ Cariorrexis. •γ Mitosis. •γ Puentes internucleares o intercitoplasmáticos. •γ Sideroblastos anulares.	•γ Anisopoiquilocitosis. •γ Hipocromía. •γ Macrocitosis o megalocitos. •γ Punteado basófilo. •γ Presencia de eritroblastos. •γ Anillos de cabot, megaloblastos. •γ Hemoglobinización defectuosa.
Disgranulopoyesis	•γ Hipo o agranularidad de los progranulocitos; hipogranularidad de mielos, metas. •γ Incremento de blastos con o sin c. de Auer, o con gránulos gigantes (pseudo Chediak-Higashi). •γ Incremento de monocitos y promonocitos.	•γ Neutrófilo hipersegmentado. •γ Seudo Pelger-Huet. •γ Neutrófilos hipo o agranulares (hialinos). •γ Neutrófilos hipergranulares. •γ Monocitos atípicos. •γ Células paramieloides.
Distrombopoyesis	•γ Micromegacariocitos mono o binucleados. •γ Megacariocitos con núcleo hipobulado o multinucleado. •γ Megacariocitos hipogranulares.	•γ Anisocitosis de plaquetas. •γ Plaquetas gigantes. •γ Plaquetas hiper, hipo o agranulares (azules). •γ Fragmentos de megacariocitos.

CITOGENÉTICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

La presencia de anormalidades cromosómicas se identifica en un 30-50% de los SMD primarios y en más

del 80% de los casos secundarios. Es característica la ganancia o pérdida de material cromosómico (las más frecuentes), aunque también se dan translocaciones, inversiones o deleciones.

Cuadro N° 5. Anormalidades cromosómicas	
Pérdidas de material cromosómico	Ganancia de material cromosómico
-5 (monosomía 5) 5q- (del (5q)) -7 (monosomía 7) 7q- (del (7q)) 9q- 20q- y-	Trisomía 8 Trisomía 21

Los SMD con anormalidades cromosómicas presentan mayor posibilidad de evolucionar a LA, respecto a los que no las presentan. De hecho, la clasificación de IPSS menciona la alteración 7q- como de mal pronóstico, al igual que el tener más de tres defectos. Algunos defectos como -y y 5q- se asocian a un mejor pronóstico. Las anormalidades cromosómicas se pueden presentar o modificar durante el curso clínico de la enfermedad, y esta situación representa un

factor pronóstico negativo. Se han identificado además alteraciones en oncogenes, genes reguladores del ciclo celular, genes apoptóticos, genes angiogénicos y factores de crecimiento, receptores de tirosina quinasa, genes reguladores de metilación de ADN y de acetilación de histonas y genes inmunomoduladores de citoquinas (Figura N° 1), que contribuyen a la etiopatogenia de estas alteraciones clonales.

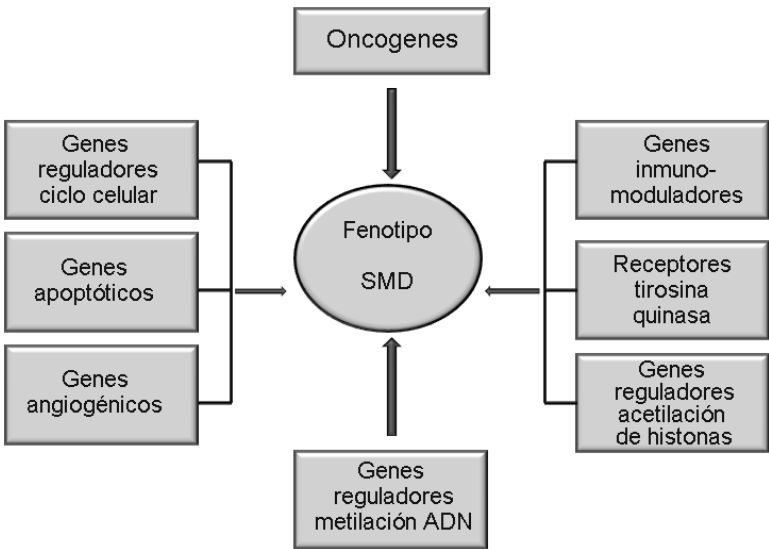


Figura N° 1. Desregulación genética en mielodisplasia (Adaptado de Nishino HT, Chang CC. Myelodysplastyc syndromes: clinicopathologic features, pathobiology, and molecular pathogenesis. Arch Pathol Lab Med 2005; 129(10): 1299-1310).

PRONÓSTICO Y EVOLUCIÓN

Una serie de factores pueden correlacionar con el pronóstico de los SMD. La clasificación FAB divide a los pacientes en dos grupos pronósticos: AR y ARSA; y AREB y AREB-T. El promedio de sobrevida en el primer grupo es similar; sin embargo, en el segundo la AREB-T tiene peor pronóstico que la AREB. En cuanto a la LMMC, la sobrevida ha sido muy variable entre diferentes series de pacientes (Cuadro N° 6).

De acuerdo con la OMS, son la AREB 1 y 2 las de pronóstico más reservado y las que más fácilmente evolucionan a leucemia aguda. Según la IPSS, se deben considerar, además, la citogenética, las citopenias y los blastos. En términos generales, la AR y la ARS tienen una sobrevida de años, mientras que la AREB es de mal pronóstico. Algunos estudios indican una sobrevivencia promedio para la AR y la ARS de 32 a 76 meses, y de 5 a 10,5 meses para la AREB.

Cuadro N° 6. Evolución clínica de mielodisplasia (según FAB)		
	Mejor pronóstico	Mal pronóstico
Hechos clínicos	Jóvenes Mujeres SMD de novo	- > 60 años. - Hombres. - SMD secundarios.
Subtipo FAB	AR o ARSA	- AREB o AREB-T. - Anemia (Hb ≤ 9 o ≤ 10 g/dl). - Neutropenia. - Trombocitopenia. - Presencia de blastos. - Diseritropoyesis. - Disgranulopoyesis. - Distrombopoyesis. - Neutrofilia (en LMMC). - Monocitosis (en LMMC).

Cuadro N° 6. Evolución clínica de mielodisplasia (según FAB)		
Aspirado en MO	Aumento basófilos tisulares	- Aumento de blastos. - Dishemopoyesis global. - Dismegacariocitopoyesis. - Reducción de megacariocitos.
Ferroquinesis	Utilización normal de Fe a los 14 días	- Baja utilización de Fe a los 14 días; eritropoyesis ineficaz aumentada.
Cariotipo	Normal 5q-, 20q-o-Y- como anormalidades únicas	- Todas las metafases anormales. - Anormalidad del cromosoma 7 o 5 y 7 juntos. - Cariotipos complejos.

Biopsia de MO en SMD

Da un panorama más confiable de la celularidad y permite detectar distribución anormal de las células. Se pueden observar islas muy grandes de eritroblastos o ausencia de estas. Otro aspecto relevante es la localización de precursores inmaduros (ALIPs) ("*abnormal localization of immature precursors*"), donde los precursores de los granulocitos se agrupan centralmente, en vez de mostrar su distribución normal paratrabecular. Los ALIPS pueden ser más importantes para el diagnóstico de la AR que una anemia secundaria, pues su presencia confirma la existencia de SMD (AREB). Por otra parte, la biopsia puede mostrar una desorganización de la arquitectura de la MO.

Evolución de los SMD

Los pacientes pueden morir por las siguientes causas:

- γ Fallo medular, debido a la expansión del clono, que origina las citopenias.
- γ Transformación a LA. Se debe indicar que la evolución natural del cuadro es la transformación.
- γ Transformación de un SMD en otro de peor pronóstico; la AR y la ARSA se pueden transformar en LMMC o en AREB, las cuales, a su vez, pueden convertirse en AREB-T. La transformación a LA se da en semanas o meses y puede terminar en una LMA (generalmente), en LLA (rara vez) o en una leucemia bifenotípica.
- γ Además, existe una interrelación con otras alteraciones clonales como: HPN, anemia aplástica y SMPC.

Tratamiento

Toma en cuenta la edad del paciente, si es mayor o menor de 50 años:

- γ Paciente mayor de 50 años, con enfermedad progresiva y buena condición física, recibe tratamiento agresivo (el mismo de la LMA).
- γ Si no tiene buena condición física, se trata con 6-tioguanina y citosina arabinósida.
- γ Si el paciente tiene menos de 50 años y no presenta un exceso de blastos, ni neutropenia o trombocitopenia, se le da tratamiento de soporte.
- γ En pacientes con muchos blastos, se considera la probabilidad de un trasplante alogénico de MO, bajo las siguientes condiciones: personas con < 20% de blastos se realiza el trasplante; si hay > 20% de blastos se da el tratamiento de la leucemia aguda y luego se efectúa el trasplante.
- γ Trasplante de células madre.
- γ El uso de factores estimulantes o interleuquinas es para acortar los periodos de citopenias post trasplante.

En realidad, la única opción de curación es el trasplante de médula ósea (TMO) o el trasplante de células madre.

BIBLIOGRAFÍA

Alfonso GM, Cabrejo MR, Flores MG, Santos I, Verri V. Síndromes mielodisplásicos. Factores pronósticos y clasificación en grupos de riesgo. Hematología 2010; 14(3): 122-130.

Bain BJ. Leukaemia diagnosis. 2 ed. London: Blakwell Science Ltd.; 1999.

Christiansen D, Andersen M, Pedersen J. Mutation of AML-1 is common in therapy related myelodysplasia following therapy with alkylating agents. Blood 2004; 104(5): 1474-1481.

Germing U, Kvendgen A. Perspectives in the prognostication of myelodysplastic syndromes. Haematologica 2005; 90(9):1157-1159.

Greenberg P, Cox C, LeBeau M, Fernaux P, Morel P, Sanz G, *et al.* International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 1997; 89(6): 2079-2088.

Liesveld J, Jordan C, Phillips G. The hematopoietic stem cells in myelodysplasia. *Stem Cells* 2004; 22(4): 590-599.

McLaughlin P, Esley E, Glasman A, Romaguera J, Sameniago T, Ayals A, *et al.* Myelodysplasia and acute myeloid leukemia following therapy for indolent lymphoma. *Blood* 2005; 105(12): 4573-4575.

Natale D. Le sindromi mielodisplastiche - Classificazione FAB e caratteristiche cliniche. (Versión en Internet). Sitio Italiano di Ematologia; 1998. Consultado en: http://web.tiscalinet.it/ematologia/doc/doc_mds2.html

Nishino HT, Chang CC. Myelodysplastyc syndromes: clinicopathologic features, pathobiology, and molecular pathogenesis. *Arch Pathol Lab Med* 2005; 129(10): 1299-1310.

Vallespi T, Imbert M, Mecucci C, Preudhomme C, Fenaux P. Diagnosis, classification and cytogenetics of Myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 1998; 83(3): 258-275.

*Dra. Berta E. Valverde Rojas
Dr. Luis F. Vásquez Castillo
Dra. Marta Navarrete Durán*

INTRODUCCIÓN

La leucemia es una enfermedad que se da como resultado de la expansión clonal de una célula progenitora (*stem cell*) linfóide o mieloide, que conserva su capacidad de autorrenovación, pero con una severa limitación para diferenciarse a célula madura. Los eventos genéticos que contribuyen a la transformación maligna incluyen inapropiada expresión de oncogenes y pérdida de la función de genes supresores de cáncer. Normalmente, los progenitores mieloides pueden dar origen a células con linaje restringido a estadios más indiferenciados o a células multipotentes capaces de producir células eritroides, granulocíticas, monocíticas y megacariocíticas; de manera que en esta neoplasia puede haber proliferación de cualquiera de estos tipos celulares, y las manifestaciones clínicas estarán directa o indirectamente relacionadas a ello y a la infiltración de tejidos normales. El aumento de la masa celular tiene efecto metabólico, mientras que la infiltración compromete la función de los tejidos involucrados.

PATOBIOLOGÍA Y FISIOPATOLOGÍA

La teoría prevalente en la fisiopatología de la leucemia se basa en la existencia de una simple célula mutante hematopoyética, que se origina a partir de un progenitor celular normal, capaz de autorrenovarse indefinidamente. Tal vez, la expresión aberrante de oncoproteínas o factores de transcripción alterados afectan los genes que regulan la hemostasia celular, como los receptores para factores estimulantes o inhibidores de crecimiento, que involucran la pérdida o alteración en los controles de proliferación normal, el bloqueo en la diferenciación, la resistencia a las señales apoptóticas y una autorrenovación aumentada, con el consecuente fracaso para limitar el compartimiento proliferativo y eliminar las células por maduración o por apoptosis.

FACTORES PREDISPONENTES

Los factores predisponentes, según su origen, se dividen en: factores hereditarios, factores adquiridos y factores congénitos (Cuadro N° 1).

Factores hereditarios y congénitos

La susceptibilidad del hospedero al daño químico, físico y radiactivo a los cromosomas, puede inducir activación de los oncogenes. Hermanos de niños con leucemia linfocítica aguda (LLA) tienen un incremento de dos a cuatro veces más de desarrollar la leucemia, en comparación con la población infantil normal, y el riesgo es mayor en los gemelos durante los primeros años de su vida. Asimismo, el síndrome de Down posee una incidencia aumentada de 10 a 20 veces para la LLA y de 600 veces en la leucemia megacarioblástica, el síndrome de Bloom, la neurofibromatosis, el síndrome de Schwachman, la ataxia-telangiectasia y el síndrome de Klinefelter.

Una sugerencia de la etiología de las leucemias infantiles (niños menores a un año), es la rara consecuencia de una respuesta inmunológica anormal a una infección común, la cual puede ser precedida por un evento mutacional que se inició *in utero*.

Factores adquiridos

Los factores adquiridos de la leucemia aguda son:

- **Sustancias químicas:** una variedad de componentes naturales y sintéticos, incluyendo quinolonas, flavonoides en los alimentos y bebidas, resinas de podofilinas, metabolitos del benceno y estrógenos, pueden inhibir la topoisomerasa, evento que se ha relacionado con actividad leucemogénica. La exposición transplacentaria a drogas que dañan el ADN, medicamentos antiinflamatorios no esteroideos e insecticidas, también han sido implicados en el desarrollo de la leucemia del infante.
- **Radiaciones ionizantes y no ionizantes:** sobrevivientes de las bombas atómicas en Japón ilustran el efecto leucemizante de la radiación. Además, algunos estudios de población han mostrado aumento en la incidencia de leucemias en familias que viven cerca de torres eléctricas o expuestas a altos niveles de gas radón radiactivo.

- **Enfermedades hematológicas predisponentes:** el síndrome mielodisplásico (SMD), la hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN), la enfermedad de Hodgkin, el mieloma múltiple, la anemia aplásica y los síndrome mieloproliferativos, especialmente la leucemia mieloide crónica (LMC), pueden inducir a la leucemia mieloide aguda (LMA).
- **Virus:** estos son los agentes más importantes en la etiología de leucemias en animales, pero no así

en humanos. Sin embargo, en la leucemia linfocítica de células T adultas, se ha demostrado la presencia del HTLV-1 en las células del paciente, con una alta incidencia en ciertas provincias de Japón y esporádicamente en el Caribe. El virus Epstein Barr (EBV) se ha encontrado integrado al genoma de las células del linfoma de Burkitt endémico en África, y de muchos pacientes con sida que desarrollan linfomas e incluso, en células de pacientes con enfermedad de Hodgkin.

Cuadro N° 1. Factores predisponentes de leucemia aguda	
Condición	Patología
Heredada	• Inmunodeficiencias: - Ataxia-telangiectasia. - Wiskott Aldrich. • Disfunción crónica de la médula ósea (MO): - Osteogénesis imperfecta (osteopetrosis). - Anemia de Fanconi. • Alteraciones cromosómicas específicas: - Síndrome de Down. - Síndrome Bloom (X frágil). - Síndrome Klinefelter. • Oncogenes transformados.
Adquirida	• Factores ambientales: - Radiación. - Agentes quimioterápicos (agentes alquilantes). - Benceno. - Terapia inmunosupresora. • Virus: - HTLV. - EBV. • Enfermedades hematológicas: - Síndromes mieloproliferativos (SMP). - Anemia aplásica. - SMD. - Mieloma múltiple. - HPN. - Enfermedad de Hodgkin.
Congénita	• Leucemia aguda en gemelos idénticos

PRESENTACIÓN CLÍNICA

La presentación de los signos y síntomas de las leucemias son sumamente variables; la mayoría de los casos se establecen de forma aguda, mientras que otros pueden desarrollar su presentación de una manera más insidiosa. La gravedad de los síntomas refleja el grado de falla medular y la diseminación extramedular, siendo la anemia, la neutropenia y

la trombocitopenia consecuencias importantes de la infiltración de la médula ósea, que conducirán a infecciones y hemorragias.

La fiebre constituye el hallazgo más común presente en poco más de la mitad de los pacientes. La fatiga y la debilidad pueden ser manifestaciones relacionadas con la gravedad de la anemia. Alrededor de un tercio de los pacientes, en especial los más pequeños, pueden

presentar dolor óseo, artralgias o impotencia funcional para caminar, debido a la infiltración del periostio o a la expansión de la cavidad medular por las células leucémicas. En los casos más extraños de LLA no se producen signos ni síntomas tempranos.

Los hallazgos al examen físico son variables e incluyen: petequias, equimosis en piel y en mucosas, dolor óseo a la exploración, así como hepatomegalia, esplenomegalia o ambas, además de adenopatías que se presentan en más de la mitad de los casos al momento de su diagnóstico y que reflejan los principales sitios de diseminación extramedular. La afección ocular se puede manifestar por hemorragias retinianas e infiltración del área ocular. Adicionalmente, la invasión subcutánea (cloroma), el aumento del

tamaño de las glándulas salivales, la parálisis de pares craneales o el priapismo debido a leucostasis e infiltración testicular, pueden ser manifestaciones de actividad leucémica.

FACTORES PRONÓSTICO

Los factores pronóstico son importantes en las leucemias, ya que permiten la subclasificación de estas para dirigir en forma más precisa el tratamiento y obtener mayores porcentajes de curación.

A continuación se muestran los factores pronósticos de la leucemia aguda (Cuadro N° 2) y de la leucemia mieloide aguda (Cuadro N° 3).

Cuadro N° 2. Factores pronóstico en leucemia aguda		
	Buen pronóstico	Mal pronóstico
ADULTOS - Edad - Leucocitos - Inmunofenotipo - Genética - Enfermedad mínima residual (EMR) después de inducción	< 35 años < 30 x 10 ⁹ /L T cortical > 50 cromosomas t(12;21) (p12-13;q22) TEL-AML1	> 60 años > 100 x 10 ⁹ /L Pro-T, T madura < 44 cromosomas BCR-ABL1 MLL-AF4/ otras MLL ≥ 5 anormalidades cromosómicas Bcl-ABL
PEDIÁTRICA - Edad - Leucocitos - Inmunofenotipo - Genética Enfermedad mínima residual (EMR) después de inducción	1 a 10 años < 50 Precursor B > 50 cromosomas ETV6-RUNX1	< 1 y > 10 años > 50 Precursor T (tímico) < 44 cromosomas BCR-ABL1 MLL-AF4/ otras MLL
	< 0,01%	> 0,01%
	< 0,01%	> 1%

Fuente: Stock W. Adolescents and young adults with acute lymphoblastic leukemia. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2010; 2010: 21-29.

Cuadro N° 3. Factores pronóstico en LMA		
	Favorable	Mal pronóstico
Citogenética	t(15,17), inv 16, t(8,21) cariotipo normal	-7, -5, t(6, 9), 11q23, 3q cariotipo complejo
Biología molecular	mutaciones en el NPM*	Mutación en el Flt-3**
Respuesta al tratamiento de inducción	EMR*** < 0,1%	EMR > 0,1%
Comienzo	Primario	Secundario

* NPM: gene de la nucleofosmina.

** FMS like tirosina quinasa.

*** Enfermedad mínima residual.

Fuente: Hoffbrand AV, Moss PA, Pettit JE. Essential Haematology. 5 ed. Malden, Mass.: Blackwell Publishing Ltd; 2006.

CLASIFICACIÓN DE LAS LEUCEMIAS

Las leucemias son ampliamente divididas en:

- Leucemias agudas: caracterizadas por un defecto en la maduración celular que conduce a un desbalance entre la proliferación y la maduración; de ahí que el clon leucémico continúe proliferando sin madurar con predominio de células inmaduras.
- Leucemias crónicas con expansión del compartimiento de células proliferantes y que mantienen su capacidad de diferenciación.

Clasificación morfológica de las leucemias agudas

El diagnóstico de leucemia aguda se establece cuando hay más de 20% de blastos en la médula ósea a la presentación clínica. Posteriormente, es subdividida en leucemia aguda linfoide o leucemia linfoblástica (LLA) y leucemia aguda no linfoide (LANL), conocida como leucemia mieloide aguda o leucemia mieloblástica (LMA), según la clasificación Francesa-Americana-Británica (FAB) sobre la base de la morfología de los blastos con tinciones del Romanovsky y citoquímicas como el ácido periódico de Schiff (PAS), mieloperoxidasas (MPO), sudán negro, cloroacetato-esterasas (CAE) y alfa-naftil-acetato esterasas (ANAE). El PAS reacciona con el glucógeno mostrando reacción fuertemente positiva, en forma de gránulos groseros, en blastos de LLA; mientras que en la LMA los blastos

pueden ser negativos o positivos, pero el patrón de tinción es difuso o finamente granular. La reacción de mieloperoxidasas es fuertemente positiva en células de serie granulocítica y débil en serie monocítica, mientras que es negativa en los linfocitos y en los precursores eritroides. La tinción sudán negro tiñe gran variedad de lípidos y correlaciona estrechamente con las MPO, aun cuando puede ser más sensible en algunos blastos mieloides.

Las esterasas son utilizadas para diferenciar serie granulocítica de monocítica: la CAE está presente en línea granulocítica y es negativa o débilmente positiva en monocitos; tiñe más fuertemente células diferenciadas y es de gran utilidad para demostrar diferenciación progranulocítica. El ANAE tiñe esterasas inespecíficas presentes en monocitos, linfocitos T y megacariocitos. El patrón de tinción es de gran utilidad para distinguir diferentes tipos celulares: los monocitos tienen reactividad fuerte y difusa, mientras que en linfocitos T y megacariocitos la tinción es más focal, sobre todo en la región paranuclear o de Golgi. La inhibición con fluoruro de sodio intenta hacer esta tinción "más específica", ya que la actividad en células monocíticas es inhibida, mientras que en otros tipos celulares la reacción persiste.

Con la información morfológica y citoquímica, el grupo FAB ha subdividido la LLA en tres tipos y la LMA en nueve variantes (cuadros N° 4 y N° 5).

Cuadro N° 4. Clasificación de la leucemia linfoblástica aguda según los criterios de la FAB

Razgos morfológicos	L ₁	L ₂	L ₃
Tamaño celular	pequeño	grande	grande
Cromatina	fin a o agumada	fin a	fin a
Forma del núcleo	regular	Irregular	regular, oval o redondo
Nucléolo	no visible	uno o más por célula, grandes y prominentes	uno o más por célula, grandes y prominentes
Cantidad de citoplasma	escaso	moderadamente abundante	moderadamente abundante
Basofilia citoplasmática	ligera	ligera	intensa
Vacuolas citoplasmáticas	variable	variable	abundantes
Reacción del PAS	+	+	-

+ usualmente presente; - usualmente ausente.

Fuente: Paraskevas F, Means R, Greer J, Foerster J, Glader B, Arber D, *et al.* Wintrobe's Clinical Hematology. 13 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2013.

Cuadro N° 5. Clasificación de la leucemia mieloblástica aguda de acuerdo con los criterios de la FAB

Subtipos	Razgos morfológicos	Citoquímica			
		C. de Auer	MPO	CAE	ANAE
M ₀ LMA con mínima diferenciación	≥ 30% mieloblastos sin gránulos.	-	-	-	-
M ₁ LMA sin maduración	≥ 30% mieloblastos con o sin gránulos.	±	+	±	-
M ₂ LMA con maduración	≥ 30% mieloblastos con gránulos; ≥ 10% promielocitos o células maduras; < 20% monocitos.	+	+	±	-
M ₃ L. Promielocítica aguda (LPA)	≥ 30% mieloblastos y promielocitos con gránulos prominentes.	++	+	+	-
M ₄ L. Mielomonocítica aguda	> 30% mieloblastos, monoblastos y promielocitos, > 20% monocitos.	±	+	+	+*
M _{5a} L. Monoblástica sin diferenciación	> 80 % monoblastos con cromatina laxa y citoplasma basófilo abundante.	-	-	-	+*
M _{5b} L. Monoblástica con diferenciación	> 80 % células monocíticas: monoblastos promonocitos, monocitos.	±	-	-	+*
M ₆ Eritroleucemia aguda	> 30% mieloblastos y/o > 50% precursores eritroides.	+	+	-	±

Cuadro N° 5. Clasificación de la leucemia mieloblástica aguda de acuerdo con los criterios de la FAB					
Subtipos	Razgos morfológicos	Citoquímica			
		C. de Auer	MPO	CAE	ANAE
M ₇ L. Megacarioblástica	megacarioblastos (morfología linfoide) con gemaciones citoplasmáticas.	-	-	±	±*

+ usualmente presente; ++ presente en abundancia; - usualmente ausente; ± puede no estar presente.

* La reacción es inhibida por fluoruro de sodio.

Fuente: Paraskevas F, Means R, Greer J, Foerster J, Glader B, Arber D, *et al.* Wintrobe's clinical hematology. 13 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2013.

Clasificación inmunológica

El desarrollo de anticuerpos dirigidos contra antígenos celulares ha facilitado el diagnóstico y la clasificación de las leucemias agudas, suministrando información con valor pronóstico. Además, ha facilitado la forma de detectar la enfermedad mínima residual e identificar marcadores de resistencia a drogas.

El análisis inmunofenotípico tiene como objetivo asig-

nar el linaje a la proliferación blástica ya establecida. Con la adición de los estudios inmunofenotípicos al examen morfológico y a las pruebas citoquímicas, el origen de las células puede ser determinado en más del 95% de las leucemias agudas. Estos análisis inmunofenotípicos se realizan por citometría de flujo y la expresión antigénica debe ser interpretada en el contexto de un panel de anticuerpos (Acs), dado que ninguno de ellos son enteramente linaje-específicos, sino que son linaje-asociados.

Cuadro N° 6. Marcadores inmunológicos utilizados en la clasificación de las leucemias agudas	
Linaje	Antígenos (Ags)
Células B Células T Mieloide Monocítico Eritroide Megacariocítico	**Tdt*CD19, CD20, CD22, CD24, CD79α **Tdt, CD7, CD5, CD2, CD3, CD4, CD8 CD13, CD33, CD15, CD11b CD14, CD11b Glicoforina A CD41, CD42b, CD61
Antígenos linaje-independientes HLA-DR CD45 CD34 CD38	HLA clase II Antígeno común leucocitario Antígeno de célula precursora Antígeno común leucocitario

*CD: cluster designation, categoría asignada por el *International Workshops on Leukocyte Differentiation Antigens* a un grupo de anticuerpos con reactividad similar frente a un panel estándar de células.

**Tdt: Deoxinucleotidil transferasa terminal.

Fuente: Paraskevas F, Means R, Greer J, Foerster J, Glader B, Arber D, *et al.* Wintrobe's Clinical Hematology. 13 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2013.

Marcadores inespecíficos

El CD34 es un marcador de células precursoras mieloides y linfoides. Está presente en el 40-60% de las LMA, particularmente en aquellas con fenotipo menos diferenciado; mientras que entre 70-80% de las LLA expresan este antígeno. El HLA-DR se encuentra en células precursoras hematopoyéticas, células B, monocitos y células T activadas. La mayoría de las leucemias son HLA-DR positivas, con excepción de la LLA-T y la LPA. El CD45, antígeno leucocitario común, se expresa en todas las células hematopoyéticas, excepto en eritrocitos y plaquetas, y no se expresa en tejidos no hematopoyéticos. Posee actividad tirosin-fosfatasa y se involucra en la regulación de crecimiento, en la activación y en la diferenciación. La mayoría de los blastos leucémicos expresan el CD45, aunque puede estar ausente en algunos casos de LLA-B. El CD38 es positivo en la mayoría de las células normales de la médula ósea, células T activadas, células plasmáticas, LLA y LMA. La expresión del CD38 en células CD34 positivas se ha asociado a linaje comprometido; aunque células CD38 negativas son capaces de autorrenovación.

Linaje células B

En la diferenciación B, los primeros Ags en aparecer son CD19 en la membrana y CD22 o CD79 α en citoplasma. De inmediato, e incluso de forma simultánea, aparece el CD10 y más tarde el CD20. Simultáneamente, el linfocito B presenta la cadena pesada μ de las inmunoglobulinas (Igs) en el citoplasma, para expresarla finalmente en la membrana. De acuerdo con estos marcadores, las LLA de origen B se clasifican en la actualidad en: B precoz o nula (CD19+, CD22 y CD79 α citoplasmático+); común (CD10+); pre-B (Igs citoplasmáticas+) y B (Igs superficie+). Los precursores B más tempranos expresan el Tdt nuclear, que coincide con el rearreglo de las cadenas pesadas de las Igs, mientras que la expresión del CD19 y del CD10 precede al rearreglo de las cadenas ligeras.

Linaje células T

Similar a los genes de las Igs; ocurre un rearreglo del receptor de la célula T (TCR) durante la diferenciación para formar un antígeno funcional con diversidad inmunológica. Se expresan dos tipos de heterodímeros del TCR: receptores compuestos por subunidades $\alpha\beta$, que están en la mayoría de las células T; y receptores con las subunidades $\gamma\delta$, que representan solo una pequeña fracción. Ambos tipos son asociados al CD3, un complejo de proteínas involucradas en señales de transducción. Los precursores tímicos se originan en médula ósea y expresan el Tdt nuclear y el CD7 en

la membrana. La mayoría de los pretimocitos también expresan el CD3 citoplasmático. La subclasificación de las células T se ha basado en la expresión del CD1 y del CD3. El estadio I o pro T, se caracteriza por la expresión del CD2, CD5 y CD7, antígenos que persisten a través del desarrollo de las células T. En el estadio II o cortical, el CD1, el CD4 y el CD8 están presentes en la mayoría de los casos, el CD3 está presente en el citoplasma y es detectado en la superficie celular en el 25% de los casos. En el estadio III o maduro, se pierde el CD1, el CD3 se expresa en la superficie celular y se define la expresión del CD4 o CD8 para linfocitos T.

Linaje células mieloides

El CD33 es expresado en mieloblastos, promielocitos, mielocitos y monocitos, así como en aproximadamente 80-90% de los blastos de la LMA. El CD13 muestra similar distribución al CD33 en células normales y está presente en el 70-80% de las LMA. Anticuerpos monoclonales dirigidos a CD11b, CD14 y CD36 reaccionan primariamente con variantes monocíticas. El CD15 se ha asociado a leucemias diferenciadas; la glicoforina A se expresa en eritroblastos después del estadio UFC-E; y los antígenos CD41 (glicoproteína IIb/IIIa), CD42b (glicoproteína Ib) y CD61 (glicoproteína IIIa) están presentes en megacarioblastos.

Leucemias inclasificables

Con el uso de los marcadores inmunológicos se ha identificado un amplio espectro de expresión inmunofenotípica. Se presentan inconsistencias intralíneas cuando hay dos líneas mieloides diferentes o entre la línea linfóide y mieloide. Las técnicas de fluorescencia múltiple han identificado al menos tres tipos de heterogeneidad: a) leucemia bilineal: con dos poblaciones de blastos de diferentes linaje, incluyendo linfoides y mieloides o linfoides T o B; b) leucemia bifenotípica: una única población de blastos con marcadores mieloides y linfoides y c) la transformación de un tipo celular en otro después del tratamiento. La más común es la expresión bifenotípica.

Se han propuesto dos mecanismos para explicar la presencia de antígenos de linaje múltiple sobre los blastos leucémicos: la transformación de un progenitor multipotencial capaz de diferenciarse en más de un linaje y mecanismos patogénicos que favorecen la formación de leucemias con antígenos de dos líneas. Al margen de los problemas conceptuales que entrañan, con frecuencia generan serias dudas diagnósticas y, consecuentemente, terapéuticas. Para su correcto diagnóstico resulta imprescindible recordar que son muy pocos los antígenos realmente

específicos de línea, aunque el empleo de un marcaje celular múltiple orientará de forma más certera el diagnóstico, en especial si se utiliza CD79 α , IgM y CD22 intracitoplasmáticos para la línea B; CD3 citoplasmático y de superficie para la línea T y mieloperoxidasa y lisozima para la línea mieloide.

ANORMALIDADES CROMOSÓMICAS

Se han demostrado anormalidades cromosómicas en la mayoría de los pacientes con leucemia aguda, útiles en el diagnóstico y pronóstico de la neoplasia. Con técnicas de bandeo en metafase se detectan anormalidades cariotípicas en cerca del 50% de los pacientes con LMA. Técnicas de bandeo de alta resolución o hibridación *in situ* por fluorescencia (FISH, por sus siglas en inglés) permiten la identificación de anormalidades citogenéticas clonales en casi todos los pacientes con leucemia aguda. De igual forma, usando técnicas moleculares, se observan anormalidades cromosómicas en más del 90% de las LLA.

En las células leucémicas es característico encontrar aumento (hiperdiploidía) o disminución (hipodiploidía) en el número de cromosomas, así como alteraciones

estructurales (translocaciones, inversiones, etc.). La ploidía es determinada por la cuantificación del número de cromosomas en metafase o por citometría de flujo.

Los histogramas del ADN generados por citometría de flujo permiten la determinación del índice del ADN (IADN), que es la razón entre el contenido del ADN de las células leucémicas frente a células normales. Las células hiperdiploides poseen un IADN mayor a 1,0 y las hipodiploides menor a 1,0. Aun cuando la citometría de flujo es una técnica simple y precisa, no identifica los sitios de pérdida o ganancia, ni detecta las translocaciones balanceadas o las células pseudodiploides (número de cromosomas aparentemente normal, pero con aberraciones estructurales). Por otro lado, la existencia de aberraciones moleculares selectivas y específicas y el desarrollo de técnicas de amplificación de los ácidos nucleicos abrieron el campo al diagnóstico molecular en el manejo del paciente. La caracterización de estas alteraciones moleculares ofrece un marcador que identifica las células de la neoplasia, lo que permite el seguimiento y la vigilancia del paciente durante y después del tratamiento (cuadros N° 7 y N° 8).

Cuadro N° 7. Principales anormalidades cromosómicas estructurales en LLA		
Anormalidad cromosómica	Genes involucrados	Proteínas
Linaje B	t (12;21)(p13;q22) t (4;11)(q21;q23) t (11;19)(q23;p13) t (9;22)(q34;q11)	TEL/AML1 AF-4/MML MLL/ENL, MLL/ELL BCR/ABL
Células LLA Pre-B	t (1;19)(q23;p13)	E2A/PBX1
LLA- B	t (8;14)(q24;q23)	MYC/IgH
LLA – T	t (1;14)(p32;q21) t (1;7)(p32;q32-6)	TAL1(SCL)/TCR $\alpha\delta$ TAL1(SCL)/TCR β

Fuente: Paraskevas F, Means R, Greer J, Foerster J, Glader B, Arber D, *et al.* Wintrobe's clinical hematology. 13 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2013.

Cuadro N° 8. Anormalidades cromosómicas estructurales en LMA	
Anormalidad cromosómica	Asociación morfológica
Trisomía 8 Monosomía 7 Monosomía 5 t (8;21)(q22;q22) t (15;17)(q21;q21) t (9;11)(p22;q23) del (11)(q22-23) inv (16)(p13;q22) t (6;9)(p23;q34) t (9;22)(q34;q11)	Variable M2, M4, M5 M1, M2 M2*, M4 M3* M5*, M4, M2 M5*, M4, M2 M4Eo*, M2, M5 M1, M4, M2; basofilia medular M1

* Estos subtipos FAB identifican fuerte asociación con anormalidades cromosómicas.

Recientemente, la Organización Mundial de la Salud (OMS) en unión con la Sociedad para la Hemopatología y la Asociación Europea de Hemopatología, publicó una nueva clasificación de las neoplasias hematopoyéticas mieloides. El principio básico del sistema propuesto

por la OMS consiste en no solo usar la morfología, sino también la información aportada por la citoquímica, el inmunofenotipo, la citogenética y la biología molecular (Cuadro N° 9).

Cuadro N° 9. Clasificación de la LMA según la OMS
1- LMA con anormalidades genéticas recurrentes: t(8;21) (q22;q22), (AML1/ETO). inv (16)(p13;q22) o t(16;16)(p13;q22), (CBFβMYH11). Leucemia promielocítica aguda t(15;17)(q22;q12), (PML/RARα). anormalidades del 11q23, (MLL).
2- LMA con displasia multilineal: Secundaria a síndrome mielodisplásico (SMD)/síndrome mieloproliferativo (SMP).
3- LMA relacionada a tratamiento quimioterápico.
4- LMA clasificadas como: LMA mínimamente diferenciada. LMA sin maduración. LMA con maduración granulocítica. LMA mielomonocítica. LMA monoblástica. Eritroleucemia. Leucemia megacarioblástica. Leucemia basofílica aguda. Mielofibrosis con metaplasia mieloide aguda. Sarcoma mieloide.

TRATAMIENTO

Con una quimioterapia combinada los pacientes con leucemia pueden ser curados hasta en un 80% (sobrevida libre de enfermedad -SLE- a los 10 años). El tratamiento comprende las siguientes etapas: inducción a la remisión, consolidación y mantenimiento. En pacientes que muestran resistencia a las drogas quimioterápicas se adicionan etapas de intensificación.

Terapia inicial general

Al ingreso los pacientes con o sin infección documentada deben recibir antibióticos intravenosos de amplio espectro, hasta que la infección sea descartada. La transfusión de glóbulos rojos está indicada en la mayoría de los pacientes para corregir la anemia severa. No debe transfundirse al paciente si tiene un conteo leucocitario igual o inferior a $100 \times 10^9/L$, debido al riesgo de sangrado y/o trombosis. Solo lo podrán hacer cuando estos hayan sido reducidos por leucoféresis, exanguinotransfusión o quimioterapia para prevenir las complicaciones de la leucostasis. La plaquetopenia debe corregirse para poder realizar la primera punción lumbar con fines diagnósticos, para evitar líquidos cefalorraquídeos traumáticos que puedan aumentar el riesgo de recaída. Después de la desaparición de los blastos circulantes, se puede aplicar la terapia intratecal sin la transfusión profiláctica de las plaquetas. Todos los hemocomponentes deben ser irradiados en los pacientes que van a recibir terapia inmunosupresora, para evitar enfermedad injerto versus huésped.

Todos los pacientes requieren hidratación intravenosa para prevenir o tratar el síndrome de lisis tumoral que resulta de la rápida destrucción de las células malignas y la salida abrupta de los iones intracelulares, ácidos nucleicos, proteínas y otros metabolitos dentro del espacio extracelular. Estos metabolitos pueden alterar los mecanismos homeostáticos normales causando hiperuricemia, hipercalcemia, hiperfosfatemia, hipocalcemia y uremia. Para prevenir o tratar la hiperuricemia se incluye el alopurinol (inhibidor de la xantina oxidasa que previene la formación de ácido úrico) y la rasburicasa (urato oxidasa recombinante que cataliza la conversión del ácido úrico a alantoina), que además de ser un metabolito excretable rápidamente, es de 5 a 10 veces más altamente soluble que el ácido úrico.

Etapas del tratamiento

1. Inducción a la remisión, cuya meta es erradicar más del 99% de las células leucémicas iniciales y la restauración hematopoyética. Esta fase incluye

la administración de glucocorticoides, vincristina, L-asparaginasa (L-ASA) y terapia intratecal triple. A los pacientes clasificados de alto riesgo se les agregará un antracíclico. Se ha demostrado que los pacientes de bajo riesgo no necesitan tanta quimioterapia para obtener la remisión y así se evita aumentar la morbi-mortalidad en ellos. El grado ideal de reemisión completa varía de un 95% a un 97%. La finalidad es reducir en forma más rápida y completa las células leucémicas, para que al término de la inducción el frotis de la medula ósea se reporte como M-1, igual o menor al 5% de blastos, que la enfermedad mínima residual esté $< 0,01\%$ y que el examen físico sea negativo. El porcentaje de muertes por toxicidad en la inducción es del 1%; otro 1% fallan en la inducción por resistencia a las drogas para la leucemia. El uso de mesilato de imatinib, un inhibidor de la tirosina quinasa, ha mejorado el manejo de la LLA con fusión BCR-ABL/t(9;22). Aunque la cura es incierta ha contribuido a mejorar la supervivencia libre de eventos y la calidad de vida.

2. Consolidación. Estando el paciente en remisión, se iniciará la consolidación. Esta fase de quimioterapia ha permitido mejorar los resultados hasta en los pacientes de alto riesgo. Se usan otras drogas como metotrexato a altas dosis con o sin 6-mercaptopurina, L-ASA a altas dosis, epipodofilotoxinas, arabinósido-citosina (ARA-C), dexametasona y vincristina. Es importante recordar que las leucemias de células T necesitan recibir altas dosis de metotrexato para producir una buena respuesta terapéutica, ya que las células blásticas de linaje T acumulan menos poliglutamatos del metotrexato que las células de linaje B.

3. Mantenimiento. Generalmente, la terapia de mantenimiento se da por dos años o más; hay estudios que reportan una duración menor, pero se necesita mayor evidencia científica que demuestre que esta reducción es la mejor opción. Se suministra 6-mercaptopurina con metotrexato durante los dos años con refuerzos mensuales o bimensuales y terapia intratecal triple. Es importante identificar la deficiencia hereditaria de la metiltransferasa tiopurina-S (TMPT, enzima involucrada en el metabolismo de la 6-mercaptopurina), debido a la neutropenia que produce en estos pacientes, siendo necesaria la modificación de la dosis.

Tratamiento de la LMA

El tratamiento de la LMA consiste en dos fases: la terapia de inducción a la remisión y la consolidación post-remisión (intensificación). Algunos ensayos han

incluido una fase de terapia de mantenimiento, pero aún no se ha demostrado el beneficio. La terapia en la inducción puede ser intensificada por un incremento en las dosis de las drogas o por una disminución del tiempo entre los cursos. La evidencia sugiere que la intensidad en la inducción mejora el último resultado.

Después de varias estrategias para intensificar la terapia, la tasa de sobrevida alcanzó una meseta en 60%, sugiriendo que futuras intensificaciones de la terapia por sí mismas no mejorarían la tasa de sobrevida. Sin embargo, los méritos de la terapia individualizada han quedado claramente demostrados, tales como el aumento en la dosis de antraciclinas durante la inducción y la consolidación, así como el uso de ATRA más 6-mercaptopurina y metotrexate durante el mantenimiento, que han resultado en tasas de sobrevida reproducibles que exceden el 80%.

Trasplante alogénico de células madre

Es la última forma de intensificación; este tratamiento beneficia a ciertos pacientes pediátricos y adultos que tienen LLA BCR/ABL positiva o aquellos con pobre respuesta al tratamiento. Hay estudios que dan los mismos resultados en los trasplantes alogénicos en adultos con células de donador no relacionado o células del cordón versus células de donador relacionado.

Tratamiento al sistema nervioso central (SNC)

Los factores asociados con un aumento en el riesgo de recaída del sistema nervioso central son: características genéticas de alto riesgo, inmunofenotipo T, alta carga de células leucémicas, un líquido cefalorraquídeo infiltrado por blastos al diagnóstico y la introducción de blastos a través de una punción lumbar traumática. La incidencia de la infiltración del SNC en las LMA, al momento del diagnóstico, es del 5% al 30%. Factores asociados con la infiltración son: hiperleucocitosis, leucemias monocíticas (M4 o M5) y edad temprana.

El uso de radioterapia es aplicado en pacientes con muy alto riesgo de recaída, con leucemia en SNC o LLA de células T con conteos leucocitarios de más de $100 \times 10^9/L$. El riesgo de un segundo tumor del SNC, o de deficiencias neurocognitivas tardías y endocrinopatías, se ha relacionado con complicaciones tanto tempranas como tardías de la radiación del SNC, por lo cual su uso ha sido ampliamente remplazado por quimioterapia sistémica e intracraneal.

LEUCEMIA AGUDA EN NIÑOS

En los últimos 50 años se ha visto un extraordinario avance en la respuesta al tratamiento de la leucemia

aguda infantil, de manera que del 30% de sobrevida libre de enfermedad ha pasado a más del 80% en países desarrollados, y ello puede ser garantizado si las condiciones físicas, emocionales y sociales son protegidas.

Por otro lado, la implementación de métodos que permitan predecir cuáles pacientes pueden ser curados con tratamientos menos tóxicos y cuáles con terapias más agresivas, es el mayor reto pendiente. Actualmente, se ha desarrollado un esquema de clasificación basado en las alteraciones genéticas presentes en los blastos y en la respuesta temprana al tratamiento.

En Costa Rica, estudios recientes han mostrado una incidencia de leucemias agudas en niños de 100 casos nuevos por millón de habitantes por año, cuya distribución es de 78% linfoblásticas (96% de estirpe B y 4% T) y 22% mieloblásticas. Las leucemias linfoblásticas pediátricas de linaje B más frecuentes son las que expresan el antígeno CD10, clasificadas como leucemia linfoblástica B común. Genéticamente, la t(12;21) correlaciona con pronóstico favorable, mientras que la presencia de la t(9;22) confiere mal pronóstico. El fallo al tratamiento correlaciona con recaídas especialmente extramedulares y no se reporta abandono del proceso en ningún paciente. Sin embargo, las infecciones representan la principal causa de muerte en inducción o remisión completa.

Más allá de ello, tecnologías emergentes en genómica y proteómica podrían conducir a sistemas de clasificación más racionales. Además, el estudio de rasgos relacionados con el paciente, como la condición socio-económica que conduce al abandono del tratamiento y el papel de las variaciones de la herencia que inciden en líneas germinales, el polimorfismo de los genes involucrados en el metabolismo de drogas que disminuyen su actividad o aumentan la toxicidad y la expresión de los genes que codifican y regulan citoquinas y apoptosis, son campos de la investigación que representan grandes retos y que suministran mayor conocimiento a la patología.

LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA DEL ADULTO

Se clasifica de acuerdo a los mismos criterios de la leucemia linfocítica aguda del niño: requiere más de 20% de blastos en la médula ósea para el diagnóstico y la presencia de marcadores de línea linfóide. El cuadro clínico también es similar, así como su clasificación en leucemias de estirpe en B o T y subvariedades. Difieren en aspectos biológicos de la enfermedad como en la frecuencia de acuerdo a la edad, frecuencia de las anomalías genéticas y la respuesta al tratamiento.

La incidencia de este tipo de leucemia es menor que la leucemia aguda no linfocítica en los adultos, pero aumenta en los pacientes mayores de 60 años, notándose además disminución de las LLA-T conforme aumenta la edad. Otro hecho importante es el incremento de las LLA secundarias a los síndromes mielodisplásicos. Comparada con la leucemia aguda del niño, la proporción de enfermos con t(9;22) es mayor, así como las t(8;14), t(14;18) y las aberraciones complejas.

Clínica

Las manifestaciones clínicas son, en su mayoría, provocadas por la falla medular: anemia, sangrado e infección; también se pueden encontrar síntomas y signos debidos a la infiltración de las células malignas a órganos dando como resultado: linfadenopatías, esplenomegalia, masa mediastinal en el caso de las leucemias de estirpe T y sintomatología del sistema nervioso central.

Pronóstico

Los factores pronósticos son iguales que en niños, pero estos son alterados por la presencia de comorbilidades de los pacientes de mayor edad. La presencia del cromosoma Philadelphia es un factor adverso, lo mismo que la respuesta tardía al tratamiento. De tal forma, la edad resulta crucial, por la presencia de padecimientos crónicos inherentes a la edad.

Tratamiento

La terapia debe incluir como soporte el uso de eritrocitos empacados para corregir la anemia, la utilización de plaquetas cuando sea necesario, prevenir el síndrome de lisis tumoral y antibióticos antifúngicos en caso de infecciones.

Los mejores resultados en pacientes adolescentes y adultos jóvenes se logran con el uso de protocolos pediátricos; el mayor problema lo constituyen los pacientes de la tercera edad, es decir, mayores de 65 años, cuya supervivencia a dos años es de 6% al 30%. En los casos de LLA con la t(9;22) se deben suministrar inhibidores de la tirosina quinasa (Imatinib®, Nilotinib®, Dasatinib®). En los pacientes de mal pronóstico se puede diseñar como estrategia el trasplante alogénico, en primera recaída. En los pacientes en recaída debe considerarse el trasplante alogénico en segunda remisión.

LEUCEMIA MIELOBLÁSTICA DEL ADULTO

En el adulto, las anomalías citogenéticas detec-

tadas al diagnóstico representan el factor pronóstico más relevante que incide sobre la remisión completa y la supervivencia libre de enfermedad. Hay evidencia consistente de que anomalías tales como las mutaciones en FLT3 y NPM1, permiten identificar subpoblaciones de pacientes con diferente respuesta al tratamiento.

Por otra parte, existe una gran proporción de pacientes clasificados en categoría de riesgo intermedio, quienes no poseen anomalías cariotípicas (40-50%) ni una variedad de cambios estructurales y numéricos extremadamente raros como para incluirlos como factor pronóstico.

El aumento de la edad es un factor adverso independiente de factores moleculares, citogenéticos y del tipo de LMA, sugiriendo el efecto de factores asociados a la edad; sin embargo, esto no debe ser una razón para no ofrecer terapia curativa, porque la edad no es el factor pronóstico más importante para la mortalidad relacionada al tratamiento o para la resistencia a la terapia.

Además de los factores adversos expuestos, la esplenomegalia y los niveles de deshidrogenasa láctica (DHL) se consideran como de efecto pronóstico.

Análisis multivariantes han demostrado que la t(15;17), la t(8;21) y la inv(16) son anomalías que confieren buen pronóstico al paciente con LMA, mientras que otros cambios citogenéticos no poseen impacto pronóstico. Algunas alteraciones genéticas no presentan efecto adverso significativo sobre la t(8;21), y alteraciones cromosómicas adicionales, como la trisomía 22, mejoran el pronóstico favorable de la inv(16). En general, se han definido como factores de mal pronóstico las t(3;5), inv(3), t(3;3), del(5q), -5, -7, del(7q), t(6;11), t(10;11), t(9;22), t(11;19) y -17, y pacientes (10-12%) con cuatro o más anomalías genéticas (cariotipo complejo).

Por otro lado, de ocho estudios realizados, siete demostraron que la detección de la enfermedad mínima residual (EMR) por citometría de flujo en LMA después de la inducción y de la consolidación, provee información pronóstico independiente.

Se recomienda repetir los aspirados de médula ósea cada tres meses durante los primeros dos años en algunos casos, y cada seis meses los siguientes dos a tres años; esto porque la mayoría de las recaídas ocurren en uno a tres años después de finalizada la terapia. Fuera de los protocolos, los aspirados de médula ósea deben hacerse si el hemograma muestra alteración; estos se recomiendan cada tres meses

durante los primeros dos años y cada seis meses después de los cinco años.

La biología molecular, la citogenética y el estudio multiparamétrico por citometría de flujo han sido técnicas exitosas para cuantificar la EMR, y el uso de estas mejora sustancialmente la evaluación de la respuesta al tratamiento.

Varias estrategias de tratamiento han sido evaluadas, incluyendo la quimioterapia convencional, la prolongación de tratamientos de mantenimiento y la terapia en altas dosis seguido de trasplante autólogo o alogénico de células madre. Sin embargo, es importante considerar la mortalidad relacionada al tratamiento, que puede variar desde un 15% a más del 50% según la estrategia elegida; de ahí que sea fundamental evaluar el beneficio de protocolos con baja mortalidad relacionada al tratamiento frente a tratamiento con mayor riesgo.

Pacientes con edades superiores a los 60 años tienen mayor probabilidad de sufrir muerte temprana relacionada al tratamiento y presentar resistencia terapéutica debido a citogenética adverse, LMA secundaria o EMR positivas. Pero, como ya se mencionó, la edad, por sí misma, no debe ser razón para evitar la terapia intensiva, ya que hay estudios que demuestran que la inducción a la remisión provee mejor calidad de vida y larga sobrevida frente a terapias paliativas.

La sobrevida de los pacientes con LMA postratamiento (LMA-t) es muy pobre, debido a varios factores: persistencia del clon leucémico, daño a los órganos, deplesión de las células madre hematopoyéticas, daño del estroma medular, refractaridad al soporte transfusional, inmunosupresión crónica y hemofagocitosis que favorece la colonización de bacterias y hongos. Además, la LMA-t se asocia a citogenética desfavorable, por lo que esta presentación leucémica se mantiene como factor pronóstico desfavorable, independiente de otras variables.

De igual manera, la LMA en recaída se evalúa tomando en cuenta algunos factores cuya presencia aumenta las posibilidades de fracaso, como son: corta duración de remisión (menos de seis meses), citogenética desfavorable, trasplante previo de células madre y edad superior a los 45 años. Según estos factores, se tomará la decisión para el tratamiento, valorando calidad de vida frente a posibilidad real de rescate.

BIBLIOGRAFÍA

Barr R, Antillón F, Baez F, Bonilla M, Moreno B, Navarrete M, *et al.* Asociación de Hemato-Oncología Pediátrica de Centro América (AHOPCA): A model for sustainable development in pediatric oncology. *Pediatr Blood Cancer* 2014; 61(2): 345-354.

Gökbuget N. How I treat older patients with ALL. *Blood* 2013; 122(8): 1366-1375.

Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, Walker H, Chatters S, Goldstone AH, *et al.* Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood* 2010; 116(3): 354-365.

Hoffbrand AV, Moss PA, Pettit JE. *Essential haematology*. 5 ed. Malden, Mass.: Blackwell Publishing Ltd; 2006.

Navarrete M, Rossi E, Brivio E, Carrillo JM, Bonilla M, Vásquez R, *et al.* Treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia in Central America: a lower-middle income countries experience. *Pediatr Blood Cancer* 2014; 61(5): 803-809.

Onciu M, Pui C-H. Diagnosis and classification. En: Pui C-H (editor). *Childhood leukemias*. 2 ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2006.

Paraskevas F, Means R, Greer J, Foerster J, Glader B, Arber D, *et al.* *Wintrobe's Clinical Hematology*. 13 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2013.

Pui C-H, Relling MV, Downing JR. Mechanisms of disease: acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2004; 350: 1535-1548.

Pui C-H. Acute Lymphoblastic leukemia. En: Pui C-H (editor). *Childhood leukemias*. 2 ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2006. p. 439-472.

Stock W. Adolescents and young adults with acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2010; 2010: 21-29.

Swerdlow S, Campo E, Harris N, Jaffe E, Pileri S, Stein H, *et al.* *Who classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. 4 ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2008.

MIELOMA MÚLTIPLE Y OTRAS GAMMAPATÍAS MONOCLONALES

*Dr. Juan E. Richmond Navarro
Dr. Jorge Fonseca González*

INTRODUCCIÓN

Las gammapatías monoclonales (GM) constituyen un conjunto de trastornos diversos asociados a una proliferación de células B maduras, que se caracterizan (con alguna excepción, como el caso del mieloma no secretor) por la secreción de inmunoglobulinas (intactas o fragmentos) homogéneas desde el punto de vista inmunoquímico y electroforético, a las que se les conoce con el nombre de componente monoclonal o componente "M". Antes se le denominaba paraproteína; sin embargo, esta denominación no es correcta, porque estructuralmente se corresponde con una proteína idéntica a la producida normalmente.

Al término gammapatías monoclonales también se le ha conocido como discrasia de células plasmáticas, mielomatosis, inmunoglobulinopatías, gammapatías y disproteinemias.

La GM constituye una alteración inmunológica muy frecuente entre la población principalmente adulta, con una tasa de incidencia aproximada de nueve casos por 100.000/año, siendo esta tasa siete veces más elevada en pacientes mayores de 60 años. En la mayoría de los casos (69%) se trata de una alteración analítica benigna que no requiere tratamiento y que solo precisa de seguimiento clínico-analítico en forma periódica, ya que no tienen consecuencias clínicas importantes a lo largo de la vida del individuo. No obstante, en ocasiones se producen manifestaciones clínicas debido a la proliferación celular clonal neoplásica o al efecto biológico de la proteína monoclonal sobre diferentes órganos o sistemas, que corresponde alrededor de un 25% de los casos que evolucionan hacia una hemopatía maligna.

Por tanto, se denomina gammapatías monoclonales porque se produce una expansión de una clona de células B que generan inmunoglobulinas idénticas entre sí, que se identifican en el electroforetograma porque tienen una carga eléctrica igual y, por ende, una movilidad electroforética homogénea y simétrica; esto va a formar una banda estrecha con un pico alto, que corresponde al llamado componente "M" o monoclonal. Para identificar las gammapatías monoclonales

es necesario realizar una inmunolectroforesis de proteínas, a fin de determinar si se trata de componente monoclonal M de cadenas livianas o pesadas.

Cada proteína monoclonal consiste en dos cadenas pesadas de la misma clase y dos livianas del mismo tipo, en contraste con las gammapatías policlonales, en las cuales la síntesis consiste en inmunoglobulinas de varias clases de cadenas pesadas y de ambos tipos de cadenas livianas.

Las diferentes clases de inmunoglobulinas monoclonales son designadas con la letra mayúscula que corresponde a la clase de cadena pesada: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE. Las subclases son IgG₁, IgG₂, IgG₄, IgA₁ e IgA₂, y sus cadenas livianas pueden ser kappa (κ) o lambda (λ).

Las dos entidades clínicas sintomáticas más importantes asociadas a trastornos de células B maduras son el mieloma múltiple (MM) y la macroglobulinemia de Waldenström (MW). En estos casos la GM es clínicamente sintomática, ya sea debido a la proliferación neoplásica de células B o a sus efectos patológicos directos sobre algún órgano diana. Sin embargo, estas dos enfermedades representan una proporción relativamente pequeña de todos los componentes monoclonales (CM) detectados en el laboratorio.

En contraposición a estos casos, existe una serie de GM que cursan de manera asintomática o, si son secundarias, con una clínica solo relacionada con la propia enfermedad de base. Dentro de este grupo de GM se encuentran las gammapatías monoclonales de significado incierto (GMSI), que corresponden a aquellos procesos con presencia de una proteína monoclonal con carácter permanente y de concentración estable en el tiempo. Para determinar este diagnóstico es imprescindible que no haya síntomas o lesiones propias de MM, MW o deterioro orgánico por depósito de sustancia amiloide o inmunoglobulinas. Además, es necesario descartar la presencia de otros síndromes linfoproliferativos como leucemia linfocítica crónica o linfomas, así como diversos trastornos asociados con gammapatía monoclonal transitoria (cuadros N° 1 y N°

2). En este sentido, una característica esencial de las GMSI es la estabilidad de la situación clínica y de las magnitudes biológicas.

Aunque la GMSI puede considerarse una etapa

pre maligna del MM, la tasa de progresión de GMSI a MM sintomático es de tan solo de un 1% anual.

Las condiciones clínicas que se asocian a gammapatías monoclonales se muestran en el Cuadro N° 1.

Cuadro N° 1. Clasificación de las gammapatías monoclonales y su frecuencia		
Gammapatía	Tipo	Frecuencia
GMSI	• γ Idiopática. • γ Secundaria: - Procesos autoinmunes. - Trasplante. - Infecciones crónicas. - Tumores metastásicos.	60-70%
GM malignas	• γ Mieloma múltiple. • γ Macroglobulinemia de Waldenström. • γ Amiloidosis primarias. • γ Enfermedad de cadenas pesadas. • γ Otros síndromes linfoproliferativos crónicos (linfoma no Hodgkin, leucemia linfocítica crónica).	12-20% 1-3% 2% Raro 5-10%

Ante la sospecha de una gammapatía monoclonal, la secuencia diagnóstica a seguir es la siguiente:

1) Historia clínica detallada, con especial énfasis en síntomas sistémicos, dolores óseos e infecciones de repetición.

2) Exploración física minuciosa, con atención especial en la valoración de coloración de la piel y mucosas, síntomas o signos neurológicos y presencia de visceromegalias.

Cuadro N° 2. Condiciones clínicas asociadas a gammapatía monoclonal	
Clínicamente sintomáticas	Sin clínica
Derivadas de enfermedades malignas de las células B • γ Mieloma múltiple y sus variantes: - Mieloma sintomático. - Mieloma quiescente, latente o asintomático. - Mieloma no secretor. - Leucemia de células plasmáticas. - Mieloma osteosclerótico (POEMS). • γ Plasmocitoma: - Óseo solitario. - Extramedular. • γ Otros procesos linfoproliferativos: - Macroglobulinemia de Waldenström. - Linfoma no Hodgkin. - Leucemia linfocítica crónica. • γ Enfermedad de cadenas pesadas (α, γ, μ).	Gammapatías monoclonales transitorias: • γ Infecciones (víricas o bacterianas). • γ Enfermedades autoinmunes. • γ Estados de inmunodeficiencia transitorios. • γ Reconstitución de la médula ósea después de un trasplante de progenitores hematopoyéticos.

Cuadro N° 2. Condiciones clínicas asociadas a gammopatía monoclonal	
Clínicamente sintomáticas	Sin clínica
Enfermedades relacionadas con la presencia de CM • γ Crioglobulinemia. • γ Amiloidosis AL. • γ Enfermedad por depósito de cadenas ligeras o pesadas. • γ Polineuropatías secundarias a CM. • γ Crioaglutininas.	Gammopatías monoclonales de significado incierto (GMSI)

COMPONENTE MONOCLONAL

En el estudio analítico adecuado de las GM deben analizarse tanto muestras de suero como de orina. En ambos casos debe pasarse por una primera fase de detección del CM, una posterior de identificación y finalmente, una de cuantificación o medida del CM. En los últimos años, algunos autores sostienen la teoría de que la detección de cadenas ligeras libres en suero puede desplazar al estudio en orina; sin embargo, esta posibilidad no cuenta aún con evidencia científica suficiente y por el momento sigue siendo necesario el estudio del CM en orina, según las recomendaciones del *International Myeloma Workshop*.

Detección del componente monoclonal

Ante la sospecha de una gammopatía monoclonal, es imprescindible que el clínico disponga desde el momento del diagnóstico, de una electroforesis de proteínas en suero con el gráfico del trazado electroforético. Ello facilita el seguimiento del CM durante la evolución, ya sea bajo tratamiento (para constatar su descenso) o en abstención terapéutica (para controlar un posible ascenso). Dada la mayor resolución gráfica de la electroforesis capilar, este es el método preferido desde el punto de vista clínico.

En todos los casos se necesita también el estudio de proteínas en orina, no solo para identificar los casos de gammopatías monoclonales de cadenas ligeras, sino también para complementar el estudio diagnóstico en gammopatías con CM de inmunoglobulinas intactas o enteras. La proteinuria de Bence Jones puede tener un valor pronóstico y evolutivo relevante (de hecho, hasta el 60% de los MM de inmunoglobulina intacta tiene proteinuria de Bence Jones).

Puesto que la observación del pico monoclonal en el trazado electroforético representa para el clínico la mejor forma de evaluar la gammopatía monoclonal,

es recomendable incorporar el gráfico del trazado electroforético.

La electroforesis de proteínas séricas constituye, por norma general, el primer paso en la búsqueda de CM. Es recomendable procesar suero en lugar de plasma, para así obviar la presencia de fibrinógeno, con movilidad electroforética similar a la de algunas inmunoglobulinas. Los CM suelen migrar en la zona γ de la electroforesis, aunque pueden aparecer en cualquier región electroforética, desde la zona α_1 hasta el extremo más catódico de la región γ , sobreponiéndose o no a cualquiera de las zonas normalmente observadas en la electroforesis. Por ello, es necesario que la interpretación final del proteinograma esté a cargo de un profesional de laboratorio experimentado. Debe analizarse el trazado electroforético para observar el aspecto y la localización del pico monoclonal, porque, como se mencionó, resulta imprescindible para estudiar la evolución del componente a lo largo del tiempo, con o sin tratamiento. Solo de este modo se puede distinguir bien si las modificaciones de la zona donde migra el CM son debidas a variaciones en el CM o a alteraciones de la fracción policlonal de las inmunoglobulinas, pues su significado puede ser completamente opuesto.

Las cadenas ligeras libres de inmunoglobulinas pueden medirse en suero por un método específico basado en una reacción inmunoquímica (Ag-Ac). El procedimiento implica la medida de los dos tipos (κ - κ - y λ - λ -) de cadenas ligeras libres de inmunoglobulinas con dos antisueros específicos distintos y con el posterior cálculo del cociente κ/λ , que es el que permite sospechar monoclonalidad, aunque no puede confirmarla.

La cuantificación de cadenas ligeras libres en suero y la medida de la ratio κ/λ es una prueba de alta sensibilidad y especificidad para la detección de monoclonalidad. De hecho, la combinación de

inmunofijación sérica y determinación de cadenas ligeras libres es capaz de identificar el 99,5% de todas las discrasias de células plasmáticas. Por eso, se considera que la determinación de cadenas ligeras libres debe realizarse siempre.

La principal utilidad de la medida de las cadenas ligeras libres de inmunoglobulinas en suero es la de poder identificar aquellas situaciones en las que la proteína monoclonal sintetizada y secretada en la circulación está presente a concentraciones no detectables por electroforesis o por un método inmunoquímico de identificación (detección negativa e identificación negativa), tales como mielomas no secretores o poco secretores, amiloidosis, enfermedad por depósito de cadenas ligeras, síndrome de POEMS, mielomas con buena respuesta al tratamiento y algunos mielomas secretores de cadenas ligeras. La presencia de un cociente κ/λ alterado en estas situaciones permite mantener un elevado índice de sospecha de persistencia de la proteína monoclonal y puede facilitar diagnósticos difíciles, así como un seguimiento más objetivo de estos casos; además, constituye un marcador tanto del grado de respuesta alcanzado con el tratamiento, como de detección precoz de recidivas.

Recientemente se han publicado unas recomendaciones internacionales en las que se resumen las principales indicaciones de la medida de las cadenas ligeras libres de inmunoglobulinas en suero:

1. En el diagnóstico, su uso junto con la electroforesis y la inmunofijación (inmunosustracción o inmunotipado) permite alcanzar mayor sensibilidad.
2. Presenta valor pronóstico en la gran mayoría de discrasias de células plasmáticas.
3. Permite un seguimiento objetivo en gammopatías con escasa secreción de proteína monoclonal.
4. En los MM tratados es necesaria la normalización del cociente κ/λ para determinar la denominada Respuesta Completa.

En GMSI, se ha descrito que la presencia de un cociente κ/λ sérico alterado constituye un factor de riesgo de progresión hacia malignidad.

Los métodos de detección del CM en suero sirven también para la detección del CM en orina, aunque con las adaptaciones pertinentes. Así como el estudio de las gammopatías monoclonales en suero es bastante uniforme entre los distintos laboratorios, en el caso de la orina, las estrategias varían de un laboratorio a otro. Las opciones más empleadas son la electroforesis en gel de agarosa y la electroforesis capilar.

La detección de cadenas ligeras libres monoclonales

en orina (proteinuria de Bence-Jones) puede realizarse por electroforesis o por inmunofijación en una muestra aislada de orina, pero la cuantificación de la proteinuria de Bence Jones (BJ) debe realizarse por densitometría en el espectro electroforético de una muestra de orina de 24 horas concentrada, no siendo recomendables para la evaluación diagnóstica ni evolutiva la medida directa de cadenas Kappa o Lambda en orina.

Aunque, se ha propuesto la monitorización de las cadenas ligeras en los mielomas, esta técnica no debe reemplazar la determinación de proteinuria BJ en orina de 24 horas. Las cadenas ligeras libres son útiles sobre todo en el mieloma no secretor u oligosecretor, en donde su uso es necesario para la evaluación de la respuesta, principalmente de la remisión completa, según los últimos criterios publicados por el *International Myeloma Working Group*.

Identificación del componente monoclonal

Una vez detectado el CM, es necesario identificar convenientemente el isotipo de inmunoglobulina que lo integra (cadena pesada y cadena ligera). Si bien en ciertos casos la medida por nefelometría o turbidimetría de las inmunoglobulinas y de las cadenas ligeras totales permite intuir el tipo de inmunoglobulina que conforma el CM, no puede nunca obviarse la identificación del CM por inmunofijación, inmunosustracción o inmunotipado. En caso de que no se haya podido detectar el CM por electroforesis, pero persista la sospecha clínica de gammopatía monoclonal, es obligatorio proceder a una inmunofijación de la muestra. Esto puede suceder en los siguientes supuestos:

- γ Mieloma múltiple oligosecretor y no secretor.
- γ Amiloidosis primaria tipo AL.
- γ Enfermedad por depósito de cadenas ligeras.
- γ Mieloma osteosclerótico o síndrome de POEMS.
- γ Plasmocitoma solitario (óseo o extraóseo).
- γ Polineuropatías por componente monoclonal.
- γ Crioglobulinemias y síndrome por crioaglutininas.

Solo después de comprobar que no se aprecia CM por electroforesis ni por inmunofijación, que el cociente κ/λ sérico es normal y que no existe proteinuria de Bence Jones, se podría excluir un diagnóstico de gammopatía monoclonal.

Todos los métodos de identificación se basan en la combinación de una separación de las proteínas por electroforesis y una reacción inmunoquímica con antisueros específicos (anti- γ , anti- α , anti- μ , anti- κ , anti- λ). El antisuero utilizado (afinidad, avidéz, título) constituye una variable fundamental de los métodos inmunoquímicos.

La inmunolectroforesis no se recomienda como método de identificación de los componentes monoclonales detectados por electroforesis, ya que posee menor resolución, practicabilidad y rapidez analíticas que los otros métodos, además de que ofrece problemas en su interpretación.

El método de identificación más extendido entre los laboratorios clínicos es la inmunofijación (IFE), debido a sus buenas prestaciones analíticas y facilidad de interpretación. Este fue el método más empleado por los participantes del Programa de Garantía de la Calidad de los Laboratorios Clínicos de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular, en el año 2007. La inmunofijación consiste en la separación de las proteínas por electroforesis en gel de agarosa, seguida de una segunda etapa de inmunoprecipitación de la proteína monoclonal con los anticuerpos específicos. El gel consta de seis canales de reacción, aplicándose muestra en cada uno de ellos para que se produzca la migración electroforética; posteriormente, en cada canal se aplica un anticuerpo determinado. Por último, se procede a la tinción del gel (violeta ácido, azul brillante de Coomassie, negro amido) y consiguiente decoloración. Igual que sucede con una electroforesis convencional, los resultados se ven influenciados por las condiciones electroforéticas y el tipo de colorante empleado.

La inmunosustracción e inmutipado son métodos de identificación de CM que se han desarrollado de manera simultánea a la implantación de la electroforesis capilar, y se han adaptado al mismo sistema electroforético. El principio del método consiste en realizar una electroforesis después de que la posible proteína monoclonal haya reaccionado con antisueros específicos en los pocillos del analizador preparados para tal uso. Así, al final de todo el estudio, a cada muestra sospechosa de tener un CM se le habrá realizado una primera electroforesis capilar (detección de CM), seguida de una reacción inmunoquímica y de una segunda electroforesis capilar que permitirá concluir el proceso. Como ventajas de estos métodos frente a la inmunofijación, puede destacarse su practicabilidad y su rapidez, puesto que se trata de un procedimiento totalmente automatizado. Como inconveniente principal destaca el hecho de que bandas muy débiles o muy tenues (sospechadas a través de la inspección del primer trazado electroforético) que levantan dudas respecto a su monoclonalidad, pueden no quedar perfectamente categorizadas. Otro inconveniente importante de estos dos métodos es que los sistemas capilares actuales no están todavía adaptados para enfrentar la muestra de suero frente a otros tipos de anticuerpos distintos de anti- γ , anti- α , anti- μ , anti- κ y anti- λ , por lo que en caso de duda debe realizarse una inmunofijación.

La presencia de cadenas ligeras libres monoclonales en orina (proteinuria de Bence-Jones) debe confirmarse por un método inmunoquímico. Cabe señalar que los métodos de identificación del CM en suero (inmunofijación, inmunosustracción o inmutipado) sirven también para la identificación del CM en orina.

Cuantificación del componente monoclonal

Junto a la electroforesis de proteínas, se recomienda proporcionar la concentración de proteínas y la concentración de cada una de las distintas fracciones del proteinograma.

Para la medida del CM se puede optar por dos principios de medida, que son la densitometría (realizada tras una electroforesis en gel de agarosa) y la espectrofotometría directa en la zona UV (efectuada a 200 nm o 214 nm, según el sistema, tras una electroforesis capilar). En cualquier caso, debe aplicarse siempre la misma estrategia de medida del CM, para evitar que el empleo de diferentes principios de medida pueda incidir en las decisiones clínicas.

La medida del componente monoclonal en orina ofrece mayores dificultades que en suero. Pueden emplearse la densitometría y la espectrofotometría UV, aunque no están exentas de inconvenientes.

SINTOMATOLOGÍA CLÍNICA

A pesar de que las hemopatías linfoplasmaclarias tienen por denominador común la proliferación monoclonal de células B, su sintomatología es variable. Esta variabilidad se debe, por una parte, a la sede u órgano de choque de la proliferación. Por ejemplo, en las leucemias linfocíticas crónicas y en las macroglobulinemias, la proliferación linfoide tiene como asiento la médula ósea, los ganglios superficiales y profundos, así como el bazo y el hígado. Las poliadenopatías y la hepatoesplenomegalia observadas en estas afecciones son raras en el mieloma. En el caso de la enfermedad de cadenas pesadas alfa, la topografía enteromesentérica de la proliferación entraña una sintomatología dominada por los problemas intestinales y las masas tumorales.

En general, uno de los signos mayores del mieloma es la osteolisis, debida a la localización de células plasmáticas mielomatosas en la médula, que secretan un polipéptido capaz de activar los osteoclastos.

En el mieloma múltiple ciertos síntomas están ligados de manera directa con la presencia de la inmunoglobulina monoclonal en el suero y, eventualmente, con su depósito en los tejidos. Algunos de esos síntomas

se deben a las propiedades fisicoquímicas de esta inmunoglobulina monoclonal circulante: síndrome de hiperviscosidad que se observa sobre todo en la macroglobulinemia y algunas veces en ciertos mielomas IgA o IgG3; hipervolemia; graves manifestaciones vasomotrices o necróticas ante la precipitación en frío (crioglobulinemia monoclonal) de la inmunoglobulina; síntomas hemorrágicos debidos a la interacción entre la inmunoglobulina monoclonal y las plaquetas o ciertos factores de la coagulación.

Por otra parte, las cadenas livianas monoclonales que constituyen la proteína de Bence Jones pueden tener un efecto nocivo sobre los túbulos renales, lo que puede producir insuficiencia renal, que es una complicación frecuente del mieloma.

Algunas manifestaciones clínicas de estos trastornos hematológicos se deben a la actividad del anticuerpo de las inmunoglobulinas monoclonales; tales como anemia hemolítica, en casos de actividad dirigida contra los antígenos eritrocitarios; y púrpura vascular, artralgias y nefropatía glomerular en las crioglobulinemias mixtas debidas a la actividad reumatoide (antiIgG) de la inmunoglobulina monoclonal y hemocromatosis, cuando la globulina es un anticuerpo anti-transferrina.

Los síntomas ligados con la presencia de la inmunoglobulina monoclonal en el suero se observan en aquellos síndromes inmunoproliferativos que se presentan con células neoplásicas maduras capaces de excretar grandes cantidades de moléculas de inmunoglobulina entera; es decir, en la macroglobulinemia y en el mieloma. Por esta razón, ambas patologías comparten la misma sintomatología. Sin embargo, no se debe olvidar que desde el punto de vista natural y de la topografía de la proliferación linfoide, la macroglobulinemia de Waldenström está mucho más cerca de la leucemia linfocítica crónica.

LAS INMUNOGLOBULINAS

La molécula de inmunoglobulina es un producto específico de la diferenciación de células linfoides y contiene cadenas de polipéptidos características, que pueden ser identificadas por medios químicos o inmunológicos.

Además de las moléculas de anticuerpo, también se consideran moléculas de inmunoglobulina las proteínas de Bence Jones, las cadenas livianas de la orina y suero normales y las porciones de cadenas pesadas de la enfermedad de cadenas pesadas.

Después de la síntesis separada de las cadenas pesadas y livianas, la cadena liviana parece liberarse

de su polisoma para formar un compartimento intracelular. Luego se combina con las cadenas pesadas unidas al ribosoma y se crea un dímero de cadenas liviana-pesada (L-H). Subsecuentemente, estas dos hemimoléculas se unen para formar una molécula de inmunoglobulina (L_2H_2). De esta forma se producen en las células plasmáticas y linfoides las inmunoglobulinas bivalentes y probablemente simétricas.

El control de algunos de estos eventos sintéticos intermedios parece ser una función de la cadena pesada, al menos para la síntesis de inmunoglobulina G (IgG); cada una de estas IgG tiene una localización y un número característico de uniones de disulfuro que son esenciales para la unión entre las cadenas.

Investigaciones iniciales sugieren que la formación de moléculas de inmunoglobulina se caracteriza por la producción de un exceso de cadenas livianas y esto se considera la fuente de la pequeña cantidad de cadenas livianas presente en suero y orina normal. Otros investigadores, sin embargo, han encontrado que la síntesis balanceada de cadenas H y L (pesadas y livianas) es más característica de la producción de inmunoglobulinas no malignas. Estos investigadores también demostraron la existencia de un pequeño, pero rápidamente utilizable, compartimento intracelular de cadenas livianas que puede ser importante en el control del ensamble de las inmunoglobulinas. Sus resultados no excluyen la posibilidad de que una diminuta cantidad de cadenas livianas pueda aparecer en la circulación como resultado de muerte celular, desprendimiento del citoplasma o desbalance de la síntesis por un número limitado de célula.

La cantidad de inmunoglobulina sintetizada y secretada por la célula individual depende de su estado de madurez. Algunas son terminales y no se dividen. Se presume que estas células se encuentran detenidas en la fase G1 del ciclo celular. Otras células que son activas y proliferantes pueden sintetizar y secretar inmunoglobulinas, sobre todo durante la fase G1, pero son menos activas cuando pasan a las fases S, G2 y M.

Las neoplasias de células plasmáticas aparecen cuando una célula de la línea B de los linfocitos, prolifera para formar una población de células similares. Se cree que dicha población es monoclonal, derivada de una célula simple, debido a que estas células producen una inmunoglobulina homogénea compuesta de una única clase de cadenas (G, A, M, D, E) o fragmentos de estos componentes.

En las células plasmáticas malignas de origen humano

o animal, se ha observado que ocurre un amplio espectro de eventos sintéticos. Se han demostrado tres patrones básicos de síntesis de inmunoglobulinas por las células plasmáticas malignas:

- a) Únicamente producción de cadenas livianas (L).
- b) Síntesis balanceada (las cadenas H y las cadenas L se producen en igual cantidad).
- c) Síntesis desbalanceada (se producen y secretan moléculas de inmunoglobulinas intactas y cadenas L en exceso).

La aparición de una proteína M (proteína monoclonal) homogénea en el patrón electroforético, provee evidencia de que la población de células producidas ha sobrepasado al menos 5x10 células, y la proteína en suero es reconocida como un pico M (mayor de 500 mg/dl).

PROTEÍNA DE BENCE JONES

La excreción de cadenas L monoclonales por la orina, como monómero o como dímero, es usualmente igual a como fueron secretadas por la célula plasmática maligna. Sin embargo, en un número de casos se demuestra que las cadenas L libres son liberadas por las células y no se les detectó en orina. Esto sugiere que la presencia o ausencia de proteína de Bence Jones en la orina depende de la tasa y monto de síntesis de las cadenas L, así como del estado renal del paciente.

En individuos sanos a los que se les inyectó proteína de Bence Jones marcada, solo el 3,6% de esta se recobró intacta en orina; el resto se degradó en el organismo, lo que comprueba que el riñón es el sitio de este proceso catabólico. Es decir, el riñón es el órgano responsable del catabolismo de las cadenas livianas normales de la proteína de Bence Jones.

Individuos con función renal normal remueven proteína de Bence Jones marcada de una tasa de 10-42% del compartimiento intravascular cada hora. La vida media de la proteína de Bence Jones o de cadenas L en la circulación es de aproximadamente cuatro horas.

Los pacientes con mieloma múltiple y función renal normal tienen gran capacidad para catabolizar la proteína de Bence Jones, a pesar de las grandes cantidades de cadenas L sintetizadas. No obstante, una declinación del estado renal por cualquier causa, establece un círculo vicioso con aumento de los niveles séricos de proteína de Bence Jones, formación adicional de cilindros y posterior declinación de la función renal. Los polímeros insolubles formados durante la secuencia normal de los eventos catabólicos

tienen significado en este contexto y pueden contribuir con la lesión renal vista algunas veces en pacientes con mieloma múltiple, llamada riñón de mieloma, una lesión cuya etiología continúa sin clarificarse.

Los procedimientos para la identificación de la proteína de Bence Jones incluyen:

- a) Precipitación con calor.
- b) Precipitación con ácidos y sales o ambos.
- c) Electroforesis e inmunoelectroforesis.

Una identificación de la proteína de Bence Jones, la mayoría de las veces, se asocia con la evaluación de laboratorio de un paciente con sospecha de tener un mieloma múltiple; sin embargo, como ya se expuso, cadenas L monoclonales se pueden encontrar en la orina de pacientes con otros desórdenes inmunoproliferativos, como macroglobulinemia de Waldenström, leucemia linfocítica crónica, amiloidosis y carcinoma.

El uso de tiras reactivas para determinar proteinuria es un método de poca utilidad para la detección de proteína de Bence Jones. En la investigación de un componente M, la electroforesis de orina es un método mucho más sensible y reproducible que la prueba de precipitación con calor. Debe concentrarse la orina al 1 g/dl, o sea, debe concentrarse unas 100 veces.

Un cierto porcentaje de casos de mieloma produce solo proteína de Bence Jones. Esto se demuestra en la electroforesis como un componente M que migra en la región beta o gama globulinas. En estos casos se debe hacer inmunoelectroforesis de la orina concentrada, para determinar la clase y tipo de componente M o para determinar si la molécula total de la inmunoglobulina monoclonal ha sido filtrada en la orina junto a las cadenas livianas.

Es importante enfatizar que algunos individuos normales pueden excretar pequeñas cantidades de polipéptidos de cadenas livianas y que la presencia de la proteína de Bence Jones solo en una concentración de hasta 60 mg/dl, no necesariamente indica que se trata de una enfermedad de cadenas livianas o de mieloma múltiple.

VISCOSIDAD SÉRICA

La viscosidad sérica se puede hacer en aquellos casos con más de 2 g de IgM monoclonal o 4 g de Ig A, o IgG de proteína por 100 ml.

Se debe utilizar un viscosímetro para medir separadamente agua destilada y suero. Se mide el tiempo que

dura en bajar el agua y el suero entre dos marcas en el viscosímetro, y se hace la relación entre el tiempo del suero y el tiempo del agua.

Para sueros normales el valor es de 1,6 o menos.

ESTUDIO CITOLÓGICO DE LA MÉDULA ÓSEA

Para el estudio de la médula ósea, la realización de un aspirado en ocasiones es suficiente. Sin embargo, la distribución heterogénea de la médula ósea, la existencia ocasional de mielofibrosis y la tendencia de las células plasmáticas a adherirse a las células del estroma, pueden hacer necesaria la realización de biopsia, en especial si la infiltración es < 10%. En la valoración histológica de un cilindro de médula ósea, se utilizará el Ac anti-CD138 para establecer el porcentaje de células plasmáticas medulares; es conveniente la evaluación de clonalidad mediante inmunohistoquímica para cadenas ligeras κ/λ citoplasmáticas. Cuando se hace aspirado y biopsia de médula ósea (MO), para efectos diagnósticos se deberá utilizar el número más alto de células plasmáticas obtenido por uno u otro método.

INMUNOFENOTIPO

La citometría de flujo permite analizar la clonalidad, cuantificando el número de células plasmáticas con fenotipo patológico o aberrante, lo que será de especial valor para diferenciar MM de GMSI, ya que la célula plasmática maligna suele tener bajos niveles de CD38 y fuerte reactividad para CD56, así como ausencia de positividad para CD19 y CD45; mientras que, por el contrario, la célula plasmática medular de sujetos sanos suele ser CD38+++, CD56-, CD19++, CD45+. Todo ello es especialmente importante cuando el porcentaje de células plasmáticas es inferior al 10%. Sin embargo, el recuento de células plasmáticas por citometría es inferior a la cantidad medida en aspirado o biopsia medular, por lo que no puede ser utilizado para diagnóstico del mieloma.

Por otra parte, el estudio inicial del fenotipo de la célula plasmática tumoral en cada caso ayuda a definir el patrón de aberración fenotípica que deberá emplearse para evaluar la enfermedad mínima residual tras el tratamiento, lo que es especialmente importante ante la remisión completa, pues en más del 40% de estos pacientes pueden detectarse células plasmáticas tumorales, lo que podría identificar pacientes con alto riesgo de recaída.

La citometría de flujo permite, asimismo, analizar el ciclo celular, que suele expresarse como índice ADN (ratio entre la moda del canal de fluorescencia de las

células plasmáticas en G0/G1, y la moda del canal de las células normales presentes en la muestra; si este índice es igual a uno, consideramos que a las células tumorales son diploides, y si es distinto a uno serán aneuploides).

CITOGENÉTICA

Las alteraciones citogenéticas en el MM constituyen uno de los factores pronósticos más relevantes y se deben considerar prioritarios dentro de estudios biológicos destinados a predecir la evolución clínica y la supervivencia de los pacientes con MM. Aunque el cariotipo en médula ósea (MO) puede dar una información extensa sobre las alteraciones cromosómicas de un paciente con MM, su aplicación práctica se ha visto obstaculizada por el reducido índice proliferativo de la célula plasmática, así como por el bajo grado de infiltración de la MO, que impiden obtener metafases analizables en más de la tercera parte de los pacientes. Esto ha llevado a que las técnicas de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) en interfase, que no requieren metafases, sean consideradas la metodología de elección para conocer el estatus genético del MM.

Según las recomendaciones del "*International Myeloma Working Group*" (IMWG) y de la "*European Myeloma Network*" (EMN) se considera esencial estudiar la t(4;14), la t(14;16) y la región 17p (P53) para discriminar los pacientes de alto riesgo.

CLASIFICACIÓN DE LAS GAMMAPATÍAS MONOCLONALES

Tal como se mencionó al inicio del capítulo, las gammapatías monoclonales se dividen en malignas y de significado incierto.

Gammapatías monoclonales malignas

a. Mieloma múltiple:

- i. Mieloma múltiple sintomático.
- i. Mieloma múltiple quiescente.
- ii. Leucemia células plasmáticas
- iii. Mieloma no secretor.
- iv. POEMS: polineuropatía, organomegalia, endocrinopatía, componente M, alteraciones cutáneas (mieloma osteosclerótico).

b. Plasmocitoma localizado:

- i. Plasmocitoma ósea solitario.
- ii. Plasmocitoma extramedular.

- c. Macroglobulinemia de Waldenström.
- d. Enfermedad de cadenas pesadas (α , β , μ , γ , δ).
- e. Amiloidosis primaria.

Gammapatías monoclonales de significado incierto (GMSI)

- a. Gammapatías monoclonal idiopática (significado incierto).
- b. Gammapatías monoclonales transitorias en el contexto de inmunodepresión (infecciones-VIH, trasplante de médula ósea, trasplante hepático o renal).

MIELOMA MÚLTIPLE

El mieloma múltiple (MM) es una proliferación neoplásica clonal de células plasmáticas (último estadio madurativo de la serie linfóide B), que secretan inmunoglobulinas de carácter monoclonal, que pueden ser detectadas en sangre y/u orina.

El MM se clasifica según el tipo de inmunoglobulina producida por el clon patológico. Lo más frecuente es que el componente monoclonal sea IgG (50-60% de los casos), seguido de IgA (30%), IgD (2%), IgM (0,5%) y raramente IgE. En un 15% de los casos el componente monoclonal está formado por cadenas ligeras que son filtradas por el riñón, detectándose solamente en orina, y se le conoce como mieloma de Bence-Jones. En el 1% de los casos no se detecta componente monoclonal ni en sangre ni en orina (mieloma no secretor).

Un componente monoclonal de pequeña cuantía puede aparecer en más del 2% de las personas mayores de 60 años, lo que suele corresponder a la entidad llamada gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI). Pese a ello, hay que hacer el diagnóstico diferencial completo con el MM, pues la actitud terapéutica es totalmente distinta.

El MM representa el 1% de todas las neoplasias y alrededor del 10% de las hemopatías malignas. La mediana de edad al diagnóstico es de 65 años. Su incidencia anual es de 3-5 casos por 100.000 habitantes. Los dos sexos son igualmente afectados.

La infiltración plasmática medular es responsable de la aparición de citopenias, destrucción ósea por activación de los osteoclastos e inhibición de los osteoblastos con la consiguiente aparición de dolores óseos, fracturas patológicas e hipercalcemia, e inmunodeficiencia por déficit de las restantes inmunoglobulinas normales, lo que predispone a infecciones. El componente monoclonal puede dar lugar a síndrome de hiperviscosidad, insuficiencia renal y problemas hemorrágicos por interacción con las plaquetas y factores de la coagulación.

El inicio de la enfermedad es usualmente insidioso, por lo que varios signos aparecen al mismo tiempo y los más insistentes de ellos obligan al paciente a ir a consulta médica.

En el 80% de los casos son los dolores óseos los que llevan al enfermo a consultar al médico. Estos dolores no son banales, sordos y profundos. Los pacientes los reportan como espontáneos, poco intensos, pero generalmente con paroxismos insoportables, presentan irradiación y rebeldes a los analgésicos habituales. Se calman solo por radioterapia. La mayor parte se localiza en el coxis, aunque también pueden localizarse en los miembros inferiores, esternón, costillas y hombros.

La frecuencia de las fracturas en el curso del mieloma varía de 20% a 40%, según los autores. Por lo general, son espontáneas o provocadas por un traumatismo o un esfuerzo mínimo. Son frecuentes en el raquis, notablemente en las últimas vértebras dorsales o en las vértebras lumbares. Estas quebraduras se traducen por dolores, algunas veces por un síndrome de compresión medular.

Los tumores óseos son poco evidentes. Se sitúan en las zonas donde el hueso se encuentra muy unido a la piel, como el cráneo o costillas. Las manifestaciones articulares se observan en un 15% de los casos. Se puede localizar el dolor en una o dos articulaciones grandes sin signos inflamatorios.

Las manifestaciones digestivas más frecuentes son en el colon o estómago. Las imágenes radiológicas son de ulceración, de tumor o de estenosis. El examen histológico permite el diagnóstico preciso. Las manifestaciones pleurales y pulmonares son del tipo pleuresía plasmocitaria, infecciones pulmonares y neumopatías mielomatosas, que son raras y consisten de infiltración plasmocitaria del pulmón. Manifestaciones neurológicas ocurren en el 20% de los pacientes con radiculopatía o con signos de cordón secundarios o compresión vertebral.

Los problemas renales son, en la mayoría de las ocasiones, la razón del diagnóstico. La proteinuria es el signo más frecuente. Por lo general, es aislada, sin hematuria ni hipertensión arterial. En el 75% de los casos se encuentra proteinuria de Bence Jones.

La insuficiencia renal propiamente dicha es frecuente en el curso del mieloma. Algunas veces es la anuria la que es reveladora, instalada en pocos días y favorecida por un episodio de deshidratación, fiebre, colapso o urografía intravenosa.

De manera más frecuente, la manifestación de un riñón mielomatoso es la insuficiencia renal crónica. Esta se encuentra ligada a signos biológicos no específicos, tales como proteinuria (cadenas livianas o albúmina), leucocituria, ausencia de hematuria, elevación de las tasas sanguíneas de urea y creatinina. Estos signos se encuentran ligados a la presencia de cilindros mielomatosos que obstruyen los tubos. Dichos cilindros son de naturaleza proteica o presentan una estructura estratificada, debido a la precipitación de capas sucesivas de paraproteína. Se sitúan en el tubo contorneado (el asa de Henle) y tubos colectores.

En contraste con las células plasmáticas normales, las células malignas en un mieloma son frecuentemente inmaduras y pueden tener la apariencia de un plasmablasto. La mayoría de los pacientes afectados presentan células plasmáticas con aneuploidías y cromosomas, en cantidad numérica y estructural anormal, sobre todo 13q- y 14q+. Estas anomalías genéticas pueden estar involucradas en la detención de la diferenciación y muerte celular normal, que conllevan a la acumulación en la médula ósea.

Por medio de análisis realizados con la técnica de FISH, se ha logrado demostrar que la monosomía del cromosoma 13 está presente en un 50-60% de los casos y es la que tiene más mal pronóstico. El mieloma múltiple es un proceso neoplásico de múltiples pasos, en el cual pueden estar involucrados la translocación del cromosoma 14 (q32) con otros cromosomas como el 11, 4, 6 y 16, pero que se encuentran con menor frecuencia.

El factor de crecimiento tumoral se encuentra elevado (más del 20%) en la médula ósea, pero también se puede encontrar alto en otros sitios. En el tejido medular óseo se han encontrado mutaciones puntuales en los oncogenes N-ras y K-ras, así como mutaciones puntuales en el p53, identificadas en regiones extramedulares.

La interleucina 6 (IL-6) es fundamental para la supervivencia y crecimiento de las células tumorales, las cuales expresan un receptor específico para esta citoquina, por lo que se considera un factor de proliferación celular y se ha demostrado su capacidad para prevenir la apoptosis. Este no es un factor de crecimiento autocrino, pero se produce por otras células dentro del microambiente medular, tales como células del estroma y otras del componente óseo que la liberan en grandes cantidades. Por lo tanto, es evidente la presencia de altos niveles de esta interleucina en el suero de los pacientes afectados, así como la sobreexpresión de su receptor soluble tipo α .

La resorción ósea que causa las lesiones óseas, se da por sobreactivación de los osteoclastos, provocada por la presencia de la interleucina-1 β , receptor soluble de IL-6 α y la IL-6. El diagnóstico del mieloma múltiple es generalmente fácil si se piensa en este; se van a buscar por una parte los signos de orientación y, por otra parte, los signos de certeza. El hemograma revela dos hechos importantes: anemia moderada normocítica normocrómica y rouleaux, en ocasiones con cuadro leucoeritroblástico. La velocidad de eritrosedimentación siempre está aumentada.

Exámenes de rutina hechos en forma sistemática, sin idea preconcebida, pueden revelar urea y creatinina aumentadas, así como presencia de proteinuria y elevación del calcio.

La β -2 microglobulina junto a la albúmina permite evaluar el estado y pronóstico del paciente.

Entre los exámenes más utilizados se encuentran:

- γ *Radiografía del esqueleto*: debe incluir, de ser posible, el examen radiológico del esqueleto entero, pues la difusión de las lesiones constituye el verdadero sustrato anatómico de la enfermedad.
- γ *Perfil proteico*: cuantificación de proteínas totales, electroforesis de proteínas, inmunolectroforesis y cuantificación de inmunoglobulinas. Este perfil proteico sanguíneo debe ser completado con un perfil proteico urinario. Las proteínas totales se van a encontrar aumentadas con una electroforesis que va a demostrar un pico o banda monoclonal en las fracciones de las beta o gammaglobulinas. La inmunolectroforesis identificará la inmunoglobulina comprometida y la cuantificación de las inmunoglobulinas, lo cual servirá para el seguimiento del paciente.
- γ *Mielograma*: en la gran mayoría de los casos, revela una proliferación celular que aparece bajo la forma de plasmacitos, donde solo el porcentaje elevado traduce la naturaleza patológica, o bajo la forma de anomalías morfológicas muy sugestivas que involucran a un pequeño número de células. Las anomalías que se deben observar son: tamaño de la célula, anomalías citoplasmáticas (células de Mott fuertemente vacuolizadas o con inclusiones cristalinas), anomalías nucleares con imágenes de mitosis patológicas o simplemente numerosas, células plurinucleadas, nucléolos voluminosos y otras.

A partir de un análisis de los rasgos clínicos de presentación, la respuesta al tratamiento y la duración de la sobrevida en un grupo de pacientes con mieloma, en los que se efectuó una medición directa del número total de células de mieloma en el cuerpo, se desarrolló un sistema de determinación de estadios en el mieloma múltiple. De tal forma, los pacientes se dividen en tres estadios sobre la base de parámetros clínicos correlacionados con la masa medular medida.

En los últimos 30 años, se han realizado una gran cantidad estudios con la finalidad de encontrar factores pronósticos, con la suficiente especificidad y sensibilidad para poder estratificar los pacientes con MM de acuerdo al riesgo, individualizando las estrategias terapéuticas.

Han sido varios los parámetros al diagnóstico, que han mostrado su valor pronóstico negativo en estudios multivariantes, como son: la edad elevada y mal estado general (ECOG 3 o 4, anemia, trombocitopenia, elevada cuantía de CM, hipercalcemia, hipoalbuminemia, insuficiencia renal, DHL elevada, PCR elevado, células plasmáticas circulantes, alto porcentaje de células plasmáticas en MO, morfología plasmoblástica

en MO, alteraciones citogenéticas t(4;14), del 17p13, ganancias 1q).

Todos esos estudios han conducido a la elaboración de múltiples sistemas de estadiaje. El primero fue el de Durie y Salmon (en 1975), que midió la masa tumoral de forma indirecta a través de una serie de parámetros (hemoglobina, calcio, cuantía de CM, lesiones óseas radiológicas). Posteriormente, en la década de los 80, el *Southwest Oncology Group* (SWOG) propuso un sistema basado en la Beta2-microglobulina y la albúmina sérica, el cual se ha perfeccionado en los últimos años.

Para intentar disponer de un sistema útil para todos los grupos de pacientes, fácil de aplicar y que pudiera ser validado y usado en un gran número de instituciones alrededor del mundo, el *Working Group* ha elaborado un Índice Pronóstico Internacional (*Internacional Score System*), cuyo acrónimo en inglés es ISS, basado en tan solo dos parámetros: albúmina y Beta2-microglobulina. Este sistema, aunque no mide la masa tumoral, es capaz de estratificar tres grupos pronósticos con distinta supervivencia, con resultados reproducibles (Cuadro N° 3).

Cuadro N° 3. Índice pronóstico ISS mieloma múltiple		
	β_2 -microglobulina	Albúmina
Estadio I	<3,5 mg/dL	$\geq$ 3,5 g/dL
Estadio II	<3,5 mg/dL o 3,5-5,5 mg/dL	<3,5 g/dL
Estadio III	> 3,5-5,5 mg/dL	

Criterios diagnósticos de mieloma múltiple sintomático

- γ Proteína monoclonal presente en suero u orina.
- γ Células plasmáticas monoclonales > 10% en MO o biopsia de plasmocitoma.
- γ Disfunción orgánica relacionada al mieloma:
 - Calcio elevado en suero (> 10,5 mg/L).
 - Insuficiencia renal (creatinina > 2 mg/dl).
 - Anemia (Hb < 10 g/dl o < 2 g el valor normal).
 - Lesión ósea (Bone) lítica u osteoporosis.
- γ Otras disfunciones: síndrome de hiperviscosidad, amiloidosis, infecciones bacterianas recurrentes (> 2 episodios en 12 meses). Otras alternativas

en MM no secretor o plasmocitoma solitario o solamente osteoporosis: células plasmáticas > 30% en MO.

Mielomas no secretores

Los mielomas no secretores son excepcionales y representan para algunos autores un estadio inicial de la afección, pues preceden las manifestaciones biológicas típicas. Se deben distinguir dos tipos:

- a) Mielomas no excretores, en los que las técnicas de inmunofluorescencia detectan inmunoglobulinas en exceso en las células plasmáticas tumorales. Se explica la ausencia de pasaje fuera de la célula por una proteólisis intracelular precoz.

- b) Mielomas no secretores, en los que la proliferación plasmacitaria es aislada. Las técnicas más finas no permiten identificar inmunoglobulinas en las células plasmáticas.

ENFERMEDADES LINFOPROLIFERATIVAS MALIGNAS

Macroglobulinemia de Waldenström

El diagnóstico de la macroglobulinemia de Waldenström (MW) es habitualmente dado por la asociación de una IgM monoclonal sérica, con una tasa igual o superior a 5 g/L y la proliferación linfoide medular, la cual la mayoría de las veces es polimorfa, es decir, incluye linfocitos, células linfoplasmarcarias y células plasmáticas maduras. Esta definición puede parecer arbitraria; sin embargo, permite darle una unidad clínica a la MW que, por otra parte, por diversos aspectos está muy cerca de otras hemopatías linfoides crónicas.

Los estudios de las inmunoglobulinas celulares permiten afirmar que toda célula implicada en la proliferación linfoide forma parte de un mismo clono de células B, donde solo los elementos maduros (células plasmáticas y linfoplasmarcitos) secretan la IgM monoclonal. Todas las células llevan en su membrana una IgM monoclonal idéntica a aquella encontrada en el suero.

La MW debe ser clasificada cerca de la leucemia linfocítica crónica, igualmente caracterizada por la proliferación monoclonal de linfocitos B. La leucemia linfocítica crónica difiere de la MW por la existencia de una detención de la maduración de linfocitos B que no se transforman en células plasmáticas, aunque en algunos casos existe un pico pequeño de inmunoglobulina monoclonal que corresponde a la persistencia de un grado débil de maduración. Estos casos pueden ser considerados como intermediarios entre la leucemia linfocítica crónica y la MW.

El hallazgo de un pico anormal en la electroforesis, junto con la identificación en la inmunoelectroforesis de una banda con el suero anti- μ , da el diagnóstico de esta entidad.

La tasa de IgM puede ser evaluada groseramente en el trazo electroforético. La medida exacta de esta inmunoglobulina necesita de una ultracentrifugación analítica, pues el método de inmunodifusión radial que suele utilizarse no permite evaluar con precisión el valor de la IgM, sobre todo por la presencia en suero de polímeros o subunidades de IgM que falsean la cuantificación.

Criterios diagnósticos de la macroglobulinemia de Waldenström

- γ El 10-20% de los pacientes presentan crioglobulinas.
- γ Las inmunoglobulinas G y A se encuentran dentro de valores normales y en algunos casos bajos. Raramente se encuentran aumentados.
- γ La velocidad de eritrosedimentación está incrementada.
- γ El 75% tiene proteína de Bence Jones.

La médula ósea es de una riqueza media; el porcentaje de células linfoides varía de 20-100%. El polimorfismo de estas células linfoides es la particularidad más importante: las células plasmáticas maduras sin anomalías morfológicas llegan raramente al 10%. Pueden estar ausentes, con lo cual la médula ósea no se diferencia de una leucemia linfocítica crónica. En menos del 5%, la infiltración plasmacitaria medular es masiva y algunas veces francamente distrófica. Los síntomas óseos pueden ser los mismos de un mieloma. En general, se presentan algunas particularidades citológicas, como: mastocitosis aislada, eosinofilia, presencia de vacuolas intranucleares o intracitoplasmáticas en ciertas células linfoides.

La MW es tres veces más frecuente en el hombre que en la mujer. Se descubre la mayoría de las veces entre los 50-70 años. La esplenomegalia está presente en el 50% de los casos. Es raramente importante en ausencia de hemólisis. Las adenopatías son rara vez voluminosas. Del 30-50% de los pacientes presentan síntomas hemorrágicos. Las hemorragias son esencialmente mucosas, retinianas y cutáneas. Las anomalías de la hemostasia primaria en ausencia de trombocitopenia son frecuentes. El recubrimiento de la plaqueta por la macroglobulina juega un papel fundamental.

Estos pacientes presentan una hiperviscosidad 3-4 veces superior a la del suero normal. La hiperviscosidad es rara cuando la tasa de IgM es inferior a 3 g/L, pero no es constante en tasas muy elevadas.

En la macroglobulinemia la nefropatía es rara y excepcionalmente se llega a la forma de nefropatía mielomatosa, en raras ocasiones con excreción de cantidades importantes de cadenas livianas. La infiltración linfoide es frecuente, pero su papel en la génesis de la insuficiencia renal es mínimo. Síntomas óseos se observan en el 10-20% de los casos. Como existen lagunas, se cree que es una proliferación plasmacitaria; sin embargo, la mayoría de las veces es linfoplasmarcitaria.

ENFERMEDAD DE LAS CADENAS PESADAS

Son definidas por un criterio biológico. Se caracterizan por la presencia en el suero de una población de moléculas de inmunoglobulinas particulares, pues no tienen cadenas livianas y representan cadenas pesadas incompletas pertenecientes a una clase o subclase de inmunoglobulina.

Se han descrito enfermedades neoplásicas en las cuales la proliferación involucra las cadenas alfa, beta y gama, pero la única enfermedad que representa una entidad clínica razonable es la enfermedad de cadenas pesadas alfa.

Las enfermedades de cadenas pesadas tienen una serie de problemas muy interesantes en dominios muy diversos:

- La estructura de la inmunoglobulina que las caracteriza.
- Por una parte, los mecanismos que a nivel de la genética celular son responsables de la síntesis de esta cadena incompleta, y por otra, en la mayoría de los casos, en donde se manifiesta una ausencia de la producción de cadenas livianas.
- La historia natural de la enfermedad y la diversidad de su expresión clínica, que es diferente a la del mieloma, y eventualmente, la no malignidad de la proliferación linfóide en un estado inicial de la afección.
- Desde el punto de vista etiológico, el posible papel de ciertos estímulos antigénicos en la génesis de la proliferación linfóide.

La enfermedad de cadenas pesadas α (alfa)

Conocida como linfoma mediterráneo; aunque en la actualidad se sabe que puede presentarse también en individuos de otras etnias y áreas geográficas. Se da especialmente en niños y adultos jóvenes.

La proliferación linfóide se localiza con predilección en las regiones del organismo donde se sintetiza la IgA secretora.

La forma respiratoria es rara; por el contrario, la forma digestiva con compromiso entero-mesentérico predominante o exclusiva es habitual. Los enfermos sufren de un síndrome de malabsorción grave y diarrea crónica con esteatorrea.

La médula ósea puede mostrar un aumento moderado en el número de las células plasmáticas, pero en general, la enfermedad involucra el hígado, bazo y otros órganos linfoides. La biopsia intestinal o la

laparotomía revelan infiltración masiva de la lámina propia y nódulos abdominales con linfocitos y células plasmáticas.

Enfermedad de cadenas pesadas μ (miu)

Se diagnostica entre los 20 y 80 años de edad. Según un estudio, de 14 casos reportados, 11 tenían una hemopatía linfóide crónica y 8 una leucemia linfocítica crónica sin otra particularidad más que una plasmocitosis excesiva en médula ósea.

Enfermedad de cadenas pesadas γ (gamma)

La sintomatología más importante es aquella que recuerda una hemopatía linfóide. Tiene mayor frecuencia en el sexo masculino. Los signos más destacados son: adenopatías (85%), esplenomegalia (67%), hepatomegalia (55%), anemia (24%), leucopenia (50%) y células linfoides atípicas circulantes (20%).

La hemopatía linfóide parece algunas veces poco diferente de la MW: infiltración de la médula ósea, ganglios y bazo por células polimorfas, linfoplasmacitarias.

Enfermedad de cadenas pesadas δ (delta)

Es bastante rara. Clínicamente, la condición es indistinguible del mieloma múltiple. En general, para el estudio de laboratorio la electroforesis simple puede no mostrar el pico monoclonal, por lo que es indispensable la inmunoelectroforesis para estudiar tales anomalías.

Es importante pensar en enfermedad de cadenas pesadas delante de:

- Un cuadro de linfoma digestivo (enfermedad de cadenas pesadas alfa).
- Un cuadro de hemopatía linfóide con histología linfoplasmacitaria polimorfa, poco frecuente, puramente linfocitaria o puramente plasmacitario (enfermedad de cadenas pesadas gamma).
- Cuadro de leucemia linfocítica crónica.

AMILOIDOSIS

Esta enfermedad fue descrita por Virchow e incluye un grupo de padecimientos que tienen en común el depósito en diversos órganos y tejidos de un material homogéneo y amorfo llamado amiloide, por su afinidad con el yodo.

Se conocen dos grupos de amiloidosis: las formas generalizadas y las localizadas. Las generalizadas incluyen algunas variedades como:

- γ Amiloidosis primaria.
- γ Asociadas a mieloma y macroglobulinemia.
- γ Amiloidosis secundarias.
- γ Amiloidosis heredofamiliares.

Las amiloidosis no generalizadas pueden localizarse en un solo órgano o sistema. En cuanto al cuadro clínico, se puede decir que la participación del riñón es común y en ocasiones puede llevar a la muerte. El corazón se afecta y los pacientes pueden sufrir de insuficiencia cardíaca; también se puede afectar el aparato respiratorio y el sistema nervioso. Es habitual la neuropatía periférica. Además, los depósitos cerebrales de amiloide pueden producir deterioro mental (síndrome de Alzheimer).

GAMMAPATÍAS MONOCLONALES BENIGNAS

Las gammapatías monoclonales benignas también se conocen con el nombre de gammapatías monoclonales de significado indeterminado (GMSI). La presencia en el suero de una inmunoglobulina monoclonal en ausencia de cualquier síntoma de proliferación de células B, es un hecho que se ha observado con el aumento en el uso de la técnica de la electroforesis de proteínas. Estas anomalías globulínicas se descubren en circunstancias variables:

- En el curso de un examen sistemático (en adultos supuestamente normales, la frecuencia de una inmunoglobulina monoclonal es de 0,3-0,9% antes de los 70 años y alrededor de 3% o más después de los 70).
- En razón de una anomalía biológica, como un aumento de la velocidad de eritrosedimentación.
- En el estudio de ciertas afecciones que se pueden acompañar de perturbaciones proteicas.

Cualquiera que sea la circunstancia por la que se descubrió la existencia de una inmunoglobulina monoclonal G o A, es necesario realizar en un inicio el estudio de anomalías citológicas, radiológicas y proteicas del mieloma. Cuando se trate de una IgM, el estudio inicial debe conllevar además el mielograma y la biopsia medular.

Las características de estas condiciones benignas son:

- γ La concentración en suero se mantiene inalterada por muchos años o puede declinar.
- γ La concentración es usualmente menor a 2,5 g/L.
- γ Las inmunoglobulinas policlonales están al menos presentes en concentraciones normales.
- γ La proteína de Bence Jones está ausente o es detectable en trazas, en orinas concentradas, solo en una minoría de casos.

- γ Las células plasmáticas de la médula ósea constituyen menos del 10% de las células nucleadas, a menos que estén asociadas con una causa de plasmacitosis reactiva.
- γ La β₂-microglobulina sérica es menor a 2 mg/L.

Se debe enfatizar que tales gammapatías monoclonales benignas pueden ser sospechadas, pero no diagnosticadas, a partir de una simple investigación. En muchos casos, la condición permanece inalterada; de hecho, muchos pacientes tienen un mieloma múltiple temprano y muestran aumento progresivo en la concentración de la paraproteína aumentada después de varios años o niveles altos en uno o dos años, acompañada por la aparición de otras características del mieloma múltiple.

En el momento de su presentación, es conveniente clasificar estos pacientes portadores de gammapatía monoclonal de significado indeterminado, debido a que el verdadero diagnóstico puede ser establecido solo después de un prolongado seguimiento.

En los estudios basados en población, la gran mayoría es benigna; no obstante, en la práctica hospitalaria alrededor de uno de tres casos muestra un progreso hacia mieloma múltiple, o en el caso de paraproteína e IgM, a macroglobulinemia de Waldenström después de 15 años.

BIBLIOGRAFÍA

Anderson KC, Shaughnessy JD, Barlogie B, Harousseau J-L, Roodman D. Multiple myeloma. En: Broudy VC, Abkowitz JL, Vose JM (editores). Hematology. Washington, DC: American Society of Hematology Education Program Book; 2002. p. 214-240.

Barrantes A, Schosinsky K, Sáenz GF, Gutiérrez A. Nociones de inmunología clínica. Teoría, técnicas e interpretaciones. San José: Universidad de Costa Rica; 1977.

Berenson J, Anderson K, Audell R, Boccia R, Coleman M, Dimopoulos M, *et al.* Monoclonal gammopathy of undetermined significance: a consensus statement. British Journal of Haematology 2010; 150(1): 28-38.

Brouet JC. Macroglobulinemia de Waldeström. Rev Prat 1979; 29(3): 317-320.

Deegan MJ. Bence Jones proteins: nature metabolism, detection and significance. Ann Clin Lab Sci 1976; 6(1): 38-46.

Durie BGM, Salmon SE. A clinical staging system for multiple myeloma. Cancer 36: 842-854, 1975.

Durie B. Patient handbook. North Hollywood, CA: International Myeloma Foundation; 2006.

Landgren O. Monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma: biological insights and early treatment strategies. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2013; 2013: 478-487.

Larocee CL, Detilleux M. Diagnostic des dysglobulinémies. *J Med Strasbourg* 1974; 5: 509.

Piquet H, Borg JY, Monconduit M, Bizet M. Myeloma: symptoms, diagnosis, treatment. *Rev Prat* 1979; 29(3): 333-336.

Ritzmann SE, Loukas D, Sakai H, Daniels JC, Levin WC. Idiopathic (asymptomatic) monoclonal gammopathies. *Arch Intern Med* 1975; 135(1): 95-106.

Ruiz Argüelles GJ. Fundamentos de hematología. 2 ed. México D.F.: Editorial Médica Panamericana; 1998.

Seligmann M. Les maladies des chaînes lourdes. *Rev Prat* 1979; 29: 373-376.

Seligmann M. Immunochemical, clinical and pathological features of alpha-chain disease. *Arch Intern Med* 1975; 135(1): 78-82.

Turesson I, Kovalchik S, Pfeiffer R, Kristinsson SY, Goldin LR, Drayson MT, *et al.* Monoclonal gammopathy of undetermined significance and risk of lymphoid and myeloid malignancies: 728 cases followed up to 30 years in Sweden. *Blood* 2014; 123(3): 338-345.

ESTUDIO DE LA MÉDULA ÓSEA: EL MIELOGRAMA

*Dr. German F. Sáenz Renauld
Dra. Lidiette Salazar Palma*

HEMATOPOYESIS Y MÉDULA ÓSEA

La formación de las células de la sangre en el adulto normal ocurre exclusivamente en la médula ósea (MO), con excepción de los linfocitos T maduros. Sin embargo, tanto los linfocitos T como los B se derivan de la médula ósea, de las células totipotenciales germinativas de los espacios de la misma médula ósea y de las células sanguíneas.

Otros órganos pueden realizar hematopoyesis, pero los huesos son los que brindan el medio óptimo para la diferenciación y multiplicación de células sanguíneas.

Antes de formarse las cavidades óseas durante el quinto mes de la vida fetal, se da la formación de células de la sangre en el saco vitelino y, más tarde, en el hígado. Durante la breve fase de saco vitelino, los eritrocitos producidos son nucleados y contienen hemoglobinas embrionarias; en el caso de las células producidas por el hígado, el bazo y la médula ósea, estas son no nucleadas y contienen hemoglobina fetal con cadenas polipeptídicas alfa y gamma.

El bazo constituye un órgano principal de complemento de la médula y aunque en el feto humano este solo efectúa una pequeña función en la hematopoyesis, entre los meses tercero y séptimo la microcirculación esplénica parece adecuada para la formación de células de la sangre.

Al nacer, las fases esplénica y hepática han terminado; sigue ocurriendo la lenta transformación de la hemoglobina fetal en hemoglobina del adulto (HbA) y todas las cavidades óseas trabajan activamente en la producción de células sanguíneas.

Durante la vida adulta, la expansión de las cavidades óseas continúa a causa de la resorción de hueso y se presenta un aumento gradual en la cantidad de tejido graso existente en todas las zonas medulares óseas. Dada la abundancia de espacio medular óseo, raramente tiene lugar en la vida posterior una reactivación compensadora de zonas extramedulares, incluso durante períodos de actividad hematopoyética acelerada. Cuando existe, la hematopoyesis extramedular

suele indicar formación sanguínea inadecuada, más que compensadora.

ESTRUCTURA DE LA MÉDULA ÓSEA

Desde el punto de vista estructural, la médula ósea se encuentra muy bien organizada, con un tejido hematopoyético. Las hileras están atravesadas por el flujo arterial que drena a los senos venosos centrales a través de una membrana basal fenestrada parcialmente, cubierta en su interior por células endoteliales, y en su exterior por células adventiciales. Las proyecciones de las células reticulares (adventiciales) subdividen a las hileras y les proporcionan sostén para las células hematopoyéticas. Asimismo, controlan los espacios hematopoyéticos disponibles, por medio de la ganancia o pérdida de glóbulos de lípidos.

Entre las hileras, los megacariocitos se encuentran en el interior de los senos, cerca del exterior de la pared de estos, aparentando “gemas” o fracciones de citoplasma; mientras que los eritroblastos están cerca de los senos venosos formando agrupamientos o islotes aparte. Cada islote (eritrona) consiste en un macrófago central y en eritroblastos en maduración o división, anidados en los compartimientos citoplasmáticos de esos histiocitos nodriza. Cuando maduran lo suficiente como para tener una vida independiente, los eritroblastos salen a través de las aberturas de los senos, luego de perder su núcleo picnótico y convertirse en reticulocitos con movimiento propio.

Los precursores granulocíticos en proceso de maduración y división, por su parte, están localizados muy adentro de las hileras hematopoyéticas y no se mueven hacia la pared del seno, sino hasta que alcanzan un estado metamielocítico móvil.

GENERALIDADES DE LA MÉDULA ÓSEA

La médula ósea es el principal órgano linfomacróforo que interviene en la elaboración de antígenos, en la inmunidad celular y humoral y en el reconocimiento y supresión de las células sanguíneas, diferenciadas gracias a un compartimiento independiente, autorrenovable de las células germinativas.

Se ha demostrado que las células madre orientadas de la médula ósea están en un ciclo celular activo, empleando técnicas de "suicidio", y que son capaces de renovarse durante largo tiempo. Sin embargo, necesitan el estímulo de "poyetinas" para emprender la transformación blástica y diferenciarse más. Se sabe que la eritropoyetina es específica de las células madre a las que corresponde la eritropoyesis; también existen varias granulopoyetinas (como el factor estimulante de colonias o FEC) y una trombopoyetina a las que correspondería la diferenciación de células madre destinadas a la granulocitopoyesis y a la trombopoyesis.

Aún en presencia de muy pequeñas cantidades de eritropoyetina, las suspensiones de médula ósea colocadas sobre coágulos de fibrina o placas de metilcelulosa, formarán delgadas colonias eritroides, integradas por 8 a 64 eritroblastos que contienen hemoglobina. A la célula causante se le ha denominado UFC-E (unidad eritroide formadora de colonias) y es probablemente idéntica a la célula madre unipotencial que responde a la eritropoyetina. Además de esta temprana aparición de UFC-E, si el medio posee grandes cantidades de eritropoyetina comienza a surgir un segundo tipo de colonia ocho a diez días después de haber iniciado el cultivo. Estas colonias adquieren dimensiones macroscópicas y pueden contener cientos de eritroblastos. Debido al irregular acoplamiento de las UFC-E con muchas subcolonias de UFC-E, se les denomina "brotes", y a la célula causante se le llama "unidad eritroide formadora de brotes" o UFB-E. A estas se les ha encontrado en la sangre periférica y en la médula ósea. Mientras las UFB-E son precursoras de las UFC-E, son insensibles a la eritropoyetina y requieren de un factor estimulante para su proliferación, al que se denomina factor estimulante de brotes (FEB).

Al parecer, la eritropoyetina promueve la proliferación de eritroblastos y su transformación. La progenie derivada de la UFC-S tendrá un número creciente de receptores de eritropoyetina, hasta que en cierto momento de la maduración las células adquieren las propiedades de la UFC-E y se originan los eritroblastos productores de la hemoglobina.

Cuando se coloca médula ósea sobre placas de agar, se ha demostrado también el crecimiento de grandes colonias de granulocitos al exponerse al factor estimulante de colonias. A estas colonias se les denomina UFC-C (unidades de cultivo formadoras de colonias) o UFC-GM. El FEC se origina de los monocitos o macrófagos y, aparentemente, es capaz de transformar en mieloblastos a las células unipotenciales encargadas de los granulocitos. En la

actualidad se ha decifrado su importancia fisiológica en la granulopoyesis "*in vivo*".

Las colonias de megacariocitos (UFC-M) se originan cuando se coloca médula ósea sobre placas de fibrina; se sugiere la existencia de una trombopoyetina como factor estimulante, aunque se desconoce su relación con la trombopoyesis fisiológica.

Los proeritroblastos y mieloblastos sufrirán tres a cinco divisiones mitóticas, que resultan en una multiplicación por 8 a 32 veces. El núcleo de megacarioblastos sufrirá el mismo número de divisiones endomitóticas, que resultarán en la formación de unas pocas células gigantes con núcleos multilobulados. Junto con la proliferación nuclear, el citoplasma sufrirá maduración específica y tres a cinco días después de la diferenciación inicial, las células estarán casi completamente maduras y funcionales.

El reticulocito y los granulocitos en maduración persisten en la médula ósea durante varios días antes de ser liberados hacia la circulación (reserva medular). La duración de este período parece depender de las necesidades inmediatas de células sanguíneas circulantes. Sin embargo, como la masa de granulocitos circulantes es mucho menor que la masa de glóbulos rojos circulantes, la liberación prematura de la reserva medular de células en maduración solo tiene importancia para el ajuste funcional del número de granulocitos periféricos. Después de liberados de la médula ósea, los glóbulos rojos son todos activos en la sangre circulante, mientras que alrededor del 50% de los granulocitos y del 30% de los trombocitos quedan aprisionados en la microvasculatura o en el bazo, como reserva funcional.

La médula ósea llena la cavidad medular de todos los huesos al nacimiento, y entre los cinco y los siete años de edad el tejido adiposo va desplazando la médula roja; en el adulto solo hay médula ósea activa en las vértebras, costillas, esternón, cráneo, omóplato, clavículas, huesos ilíacos y epífisis proximales del fémur y del húmero. También, conforme avanza la edad, la médula en estos huesos cambia su contenido en tejido graso. Así, en los adultos jóvenes la mitad es tejido graso y la otra mitad es roja, mientras que en personas de avanzada edad (sesenta-ochenta años), las dos terceras partes son grasa y una tercera parte es médula ósea roja.

La cavidad medular de los huesos está dividida en compartimientos por las trabéculas óseas, en cuya luz hay un material gelatinoso rico en grasa que contiene las células hematopoyéticas.

La cantidad total de médula ósea activa en el adulto oscila entre 3,4% y 5,9% del total del peso, de 1.600 a 3.700 g; por tanto, se puede decir que el peso de la médula ósea equivale aproximadamente al del hígado.

La médula ósea puede incrementar su capacidad de producción de seis a doce veces, aumentando su tejido hematopoyético y reduciendo las cavidades grasas, acortando el tiempo de maduración celular y probablemente acelerando también el tiempo de generación celular.

El análisis de la médula ósea proporciona datos de valor clínico para el diagnóstico de un sinnúmero de enfermedades hematológicas y de los órganos hematopoyéticos; en particular, sirve para establecer un diagnóstico, como ayuda cuando la sangre periférica muestra resultados sospechosos, atípicos o poco concluyentes, y para evaluar el resultado del tratamiento en los casos de neoplasias.

El examen citológico de la médula ósea requiere de mucha experiencia y capacidad, ya que es una labor difícil. No obstante, un observador cuidadoso se puede entrenar para poder realizar estos estudios.

OBTENCIÓN DEL MATERIAL MEDULAR

La médula ósea normal es suave y semifluida, por lo cual puede ser removida fácilmente por aspiración; mediante este método puede obtenerse al mismo tiempo una biopsia para estudios por parte del patólogo.

Al respecto, es importante aclarar que el material adquirido por biopsia es trabajado por los patólogos, y solo el material obtenido por aspiración es el manejado por los hematólogos.

Aspiración

Este es el procedimiento usual para estudios de médula ósea. Muchos sitios pueden ser utilizados para obtener el material; sin embargo, los lugares preferidos son el tercio superior de la tibia en el lactante; las crestas ilíacas anteriores y posteriores en los niños y adolescentes; y las crestas ilíacas y el esternón en adultos. Para obtener el material se pueden utilizar agujas de diversos tamaños y se puede extraer el material con jeringas pequeñas o grandes. Es necesario esterilizar de forma adecuada la zona establecida y actuar en todo momento con una técnica completamente aséptica. Algunos utilizan anestésicos locales, como hidrocloreuro de procaína al 1%, antes de introducir la aguja; no obstante, el dolor que causa la extracción no disminuye con este tipo de anestesia. La aguja se debe introducir siempre con mandril para que

no se obstruya con el hueso. Hasta que se sienta que se está en la cavidad medular, se quita el mandril y se aspira de 0,2 a 0,5 ml con la jeringa; luego se saca junto con la aguja. Se extienden los frotis inmediatamente para evitar que el material se coagule y se cultiva una porción del material en caso de que se requiera. La aspiración medular que se realiza de manera correcta carece de peligros y complicaciones, y para efectos prácticos, es de gran ayuda para el estudio de los pacientes hematológicos. Su principal deficiencia es la poca cantidad de muestra que se extrae, que no es representativa del total de la médula ósea; y es que no se recomienda aspirar mucha médula, pues existe mayor riesgo de diluir el material con sangre circulante.

Biopsia

La biopsia medular se efectúa cuando el material obtenido por aspiraciones repetidas es inadecuado o bien, para obtener una mayor cantidad de material medular o estudiar la arquitectura medular. En este caso, se utiliza el método de trepanación con una aguja para biopsia, teniendo todos los cuidados que se requieren para la aspiración. El material obtenido debe enviarse rápidamente al Servicio de Patología para los cortes respectivos.

Parte del aspirado o de la biopsia se puede utilizar para realizar cultivos, en caso de que se requieran. Las modernas agujas permiten la obtención secuencial de aspirado y de material para biopsia.

PREPARACIÓN DE MATERIAL ASPIRADO

Inmediatamente después de aspirado el material, se colocan pequeñas gotas en varios portaobjetos limpios, sobre las cuales se coloca otro portaobjetos de manera transversal. Al irse extendiendo, la gota corre de manera rápida en el portaobjetos de arriba. Así el material queda distribuido de manera homogénea, lo cual no se logra si el frotis se realiza en forma de rodillo, como se hacen los extendidos de sangre periférica.

Cuando el material se debe cultivar, pueden colocarse unas gotas de médula ósea en un tubo estéril que contenga una gota de heparina y enviarlo al laboratorio. O bien, el hematólogo puede colocar directamente las muestras en diferentes medios de cultivo y llevar de inmediato al laboratorio.

Cuando se desea analizar el hierro de depósito en médula ósea, deben hacerse frotis muy gruesos y ponerlos a escurrir después en forma vertical, para reducir ligeramente el grosor y dejar todos los grumos medulares en la laminilla. El depositar el material en la parte superior de un portaobjetos, colocado

previamente en posición vertical (90°), permite seleccionar mejor el material grumoso que se frota para el estudio, tanto de la citología como de los depósitos de hierro.

ANÁLISIS DEL MATERIAL

La información que se obtiene del análisis rutinario de una médula ósea incluye la estimación a bajo poder de la celularidad; el conteo y la observación morfológica de los megacariocitos para evaluar su diferenciación plaquetaria; la estimación a alto poder del detalle morfológico y cómputo de todos los elementos celulares; la estimación de los depósitos de hierro y la búsqueda e identificación de células tumorales, depósitos, parásitos y granulomas.

Cabe mencionar que el cómputo de células en médula ósea usualmente no se realiza, debido a la gran variación de elementos nucleados que hay en el material extraído. Los cómputos pueden variar desde 20.000 hasta 150.000 células/ μ l. Estos límites tan amplios también alteran los porcentajes individuales de células y deben contarse siempre de 500 a 1.000 células para obtener un cómputo porcentual representativo.

El análisis del material inicia examinando las preparaciones a bajo poder y observando la celularidad, el número de megacariocitos, los grumos celulares, las células gigantes y de depósito, los granulomas y los folículos linfáticos (Cuadro N° 1).

Cuadro N° 1. Médula ósea: marcha analítica

Estudio a bajo poder microscópico: celularidad, número de megacariocitos.

- **Identificar células gigantes:** histocitos, macrófagos, grumos, nidos tumorales y fragmentos de estroma para evaluar hierro tisular.
- **Seleccionar** áreas de frotis para estudio citológico:
 1. Efectuar el mielograma descriptivo y la relación G: E.
 2. Cuantificar porcentaje de células plasmáticas, linfocitos, monocitos y células granulocíticas.
 3. Proceder igual con la biopsia (10-15% de diagnósticos pasan inadvertidos solo con aspiración).

Posteriormente se estudia la diferenciación plaquetaria de varios megacariocitos y luego se elige una zona adecuada para hacer el diferencial celular, que incluye las células plasmáticas y las reticulosas (Cuadro N° 2).

Este se hará con el objetivo de inmersión, observando en forma cuidadosa cada célula y anotando todas las anomalías morfológicas y grado de diferenciación, y definiendo si las células son normales en la médula ósea o si son foráneas, si hay diseritropoyesis o mielodisplasia global, presencia de parásitos y células anormales.

Para el análisis de parásitos, depósitos de hierro, células ectópicas e, incluso, para saber si la muestra es realmente médula, deben buscarse grumos y partículas medulares que por lo general tienen fibroblastos, células plasmáticas y linfocitos.

Otro dato que se debe obtener del análisis de la médula ósea es la relación mieloide-eritroide (G:E), entre el número total de células granulocíticas y las eritrocíticas. Este se obtiene dividiendo el número

de las primeras por el número de las segundas. La relación (G:E) en el adulto es de 2 a 7 ($x = 3,5$); al nacimiento es de 1,8 a 2,5 y al año de vida es de 3. Lógicamente, los linfocitos no se toman en cuenta para obtener este índice.

Por último, se anota la impresión diagnóstica de la médula analizada.

Es importante señalar que la aspiración y la biopsia son procedimientos que no se excluyen en el diagnóstico hematológico (cuadros N° 2 y N° 3). El aspirado da mejor idea de la citología, mientras que la biopsia lo da en histioarquitectura; por lo tanto, es indispensable para evaluar tejido hematológico, fibroso, óseo, tumoral y granulomatoso.

COEFICIENTE MITÓTICO

Las células circulantes de la sangre no tienen la capacidad de reproducirse, a excepción de los linfocitos y los monocitos. En otras palabras, la mayoría de las células terminales de las series hemopoyéticas (células

diferenciadas) no se reproducen. La división celular, que permite la producción incesante de elementos sanguíneos, se lleva a cabo en las células madres y en aquellas aún con cierto grado de inmadurez. Se tiene como principio que la reproducción celular es

tanto más frecuente, cuanto más indiferenciada sea la célula. En la mayoría de los casos, las características del citoplasma permiten reconocer la identidad de las células en mitosis.

Cuadro N° 2. Aspiración de médula ósea: información citológica

1. **Celularidad y megacariocitos.**
2. **Evaluación cualitativa de la hemopoiesis:** mielograma descriptivo y porcentual.
3. **Detección** de células anormales y grumos metastásicos.
4. **Evaluación de las reservas de hierro** y de sideroblastos.
5. **Investigaciones citoquímicas y citogenéticas.**
6. **Estudios fenotípicos** de Ag de superficie por **citometría de flujo** o inmunocitoquímica.

Cuadro N° 3. Biopsia de médula ósea: información histológica

1. **Celularidad:** especialmente valiosa en condiciones hipoplásicas (anemia aplástica, luego de quimioterapia y en algunos síndromes mielodisplásicos para determinar el porcentaje de grasa).
2. **Arquitectura:** localización y relación de las tres series; obtención de la relación G:E.
3. **Asentamiento** o infiltración de linfoma maligno o de enfermedad de Hodgkin.
4. **Asentamiento o infiltración** de metástasis neoplásicas.
5. **Detección desórdenes mieloproliferativos:** mielofibrosis (reticulina) y de reacciones fibróticas (Hodgkin y carcinoma metastásico).
6. **Diagnóstico de enfermedades caracterizadas por granulomas:** sarcoidosis, infecciones (tuberculosis).
7. **Evaluación morfológica ósea:** en mieloma, hiperparatiroidismo y enfermedad del hueso (Paget).

Se designa con el nombre de coeficiente mitótico al porcentaje de células en mitosis para cada estado celular dentro de una misma línea o para todas las células de una determinada línea. Se dan valores de 5% a 6% de mitosis para la serie granulocítica y de 15% a 18% para la eritrocítica. Se ha estimado que de 100 mitosis que se observan en los frotis de médula ósea normal, aproximadamente 67 corresponden a eritroblastos policromatófilos. Esto se considera lógico cuando se ve que tiene que compensarse el menor número de eritroblastos (en relación con los granulocitos) con una activa capacidad proliferativa, a fin de que se produzcan los billones de billones de eritrocitos que diariamente pasan a la circulación.

La mitosis en los proeritroblastos es poco frecuente; son muy abundantes en el estado de policromatófilo y en menor grado, en los eritroblastos basófilos. En los ortocromáticos no existen mitosis, lo que demuestra que en este estado de maduración predominan los procesos madurativos sobre los proliferativos.

En la serie granulocítica, las mitosis son muy raras en los mieloblastos (0,29%). En números absolutos, el porcentaje de mitosis de los mielocitos normalmente es de 5-6%. Para otros autores, los valores corresponden a los progranulocitos (5-7%). Los metamielocitos, las células en banda y los segmentados ya no se dividen.

REPORTE SUSCINTO DEL MIELOGRAMA (Cuadro N° 4)

En ocasiones no es necesario, ni de interés, reportar en forma completa un mielograma. Incluso, se puede llegar al extremo de solo indicar el total porcentual de células granulocíticas (diferenciadas o no entre sí) y de células eritroblásticas. Es también muy usual reportar los granulocitos de la siguiente forma:

1. **Granulocitos inmaduros o jóvenes:** incluye mieloblastos, progranulocitos, mielocitos y metamielocitos.

2. Granulocitos maduros: incluye las células en banda y los segmentados.

capacidad progenitora de plaquetas en activos, inactivos.

La eritrocítica se reporta bajo un solo término: eritroblastos (total en %). Asimismo, los megacariocitos se reportan de la siguiente manera: aparentemente en número normal, disminuido o aumentado y su

Otros tipos de reportes se realizan con un poco más de detalle e, incluso, algunos indican los valores considerados como normales por ciertos autores de renombre. He aquí un ejemplo de ese tipo de reporte.

Cuadro N° 4. El mielograma (%)		
Célula	Valores normales según:	
	OSGOOD	WINTROBE
Mieloblastos	0,4 (0-1)	1,2 (0.3-5)
Progranulocitos	1,4 (0-3)	5 (1-8)
Mielocitos neutrófilos	4,2(0-12)	12 (5-19)
Metamielocitos neutrófilos	6,5 (3 –10)	22 (13 – 32)
Segmentados neutrófilos y bandas	39 (22-58)	20 (7- 30)
Eosinófilos maduros	2 (0-4)	2 (0,5-4)
Eritroblastos basófilos	2 (0-4)	
Eritroblastos policromatófilos	6 (4-8)	18 (7-32)
Eritroblastos ortocromáticos	3 (1-5)	
Linfocitos	14 (3-25)	10 (3-17)
Monocitos	0,3 (0-1)	0,4 (0-2)
Monocitos	0,3 (0-1,5)	0,4 (0-2)
Plasmacitos	0,3 (0-1)	0,2 (0,1-0,2)
Células reticulares	0,3 (0-1)	0,2 (0,1-0,2)
Relación G:E	3,6: 1 (2:1- 8:1)	3: 1- 4:1

A continuación se muestra un reporte más completo de este tipo de análisis, el cual es el resultado de una serie de comparaciones de los distintos cómputos

diferenciales que diversos investigadores han propuesto como normales para adultos (Cuadro N° 5) y niños (Cuadro N° 6).

Cuadro N° 5. Mielograma normal adultos *				
		Tipos de células	Promedio	Límites normales
Serie eritrocítica 19,1%	Eritroblastos jóvenes 2,9%	Proeritroblastos Eritroblastos basófilos	0,5 2,4	0,2-4,0 1,5-5,8
	Eritroblastos maduros 16,2%	Eritroblastos policromático Eritroblastos ortocromático	11,7 4,5	5,0-26,4 1,6-21,5

Cuadro N° 5. Mielograma normal adultos *				
		Tipos de células	Promedio	Límites normales
Serie leucocítica y otros elementos 70%	Granulocitos 57,4%	Mieloblastos	1,2	0,3-3,1
		Progranulocitos	3,0	0,5-4,5
		Mielocitos neutrófilos	8,7	0,9-20,3
		Metamielocitos neutrófilos	11,0	5,6-22,0
		Células en banda	17,9	6,1-36
		Segmentados neutrófilos	13,6	8,7-27
		Eosinófilos	2,0	0-5
		Basófilos	0,2	0-1
	Otros elementos 12,6%	Linfocitos	9,8	2,7-24
		Monocitos	1,4	0,7-2,8
		Megacariocitos	0,2	0,03-0,4
		Plasmacitos	0,6	0,1-0,5
		Células reticulares	0,6	0,03-1,5
No identificables	No identificables 10,9%	Células no clasificadas	1,7	0,02-3,3
		Células desintegradas	10,0	1,1-20,8

* Adaptado de: Albritton E (editor). Standard values in blood. Philadelphia: W.B. Saunders Co.; 1953.

Cuadro N° 6. Mielograma: valores normales en niños *										
Célula	1-2 meses	3-12 meses	1-2 años	3-4 años	5-6 años	7-8 años	9-10 años	11-12 años	13-14 años	15-16 años
Mieloblastos	1,6	1,9	0,7	1,4	1,8	1,0	1,4	1,1	1,2	1,3
Progranulocitos	5,6	1,8	3,4	3,2	3,2	1,8	2,0	1,7	1,1	1,9
Mielocitos	18,1	16,7	13,3	15,9	17,2	17,4	16,5	15,3	16,4	16,8
Metamielocitos	25,6	23,9	21,8	22,0	22,9	23,4	26,1	22,2	21,6	23,2
Bandas y segmentados	9,3	7,2	14,1	6,4	12,6	12,3	10,9	12,2	12,2	13,3
Proeritrobl.	0,8	0,6	0,8	0,4	0,5	0,4	0,3	0,2	0,4	0,5
E.Basófilo	1,9	2,1	1,2	1,0	1,2	1,7	1,6	1,8	1,3	2,2
E. Prolícom.	12,6	14,5	19,5	16,4	17,3	19,4	19,1	21,8	18,3	15,1
E. Ortocrom.	1,6	2,5	2,1	1,2	3,6	3,4	2,4	2,7	3,1	2,5
Linfocitos	19,7	25,4	19,3	18,6	17,5	13,6	13,6	16,0	18,1	17,4
Relación G:E	5,3	3,5	2,5	3,4	2,8	2,6	2,9	2,3	2,7	3,3

* Adaptado de: Jackson Memorial Hospital, Miami.

Médula ósea en infantes y niños

El mejor sitio para obtener muestras de médula ósea en niños es la cresta ilíaca. Fácilmente se pueden obtener 0,2 ml de médula. Es necesario administrar algún sedante para el paciente antes del procedimiento, así como anestesia local en el sitio de la punción. En niños muy aprehensivos, puede aplicarse una pequeña anestesia general. Para infantes menores de seis meses, se aconseja la punción en la tibia. Las características generales del mielograma en estas edades son las siguientes:

1. La médula es celular (300.000 a 400.000/ul), pero hay gran variación.
2. En las primeras dos semanas los eritroblastos son muy numerosos (arriba del 70%).
3. Los eritroblastos disminuyen rápidamente después del nacimiento y los granulocitos comienzan a ser más numerosos, como sucede en la médula de los adultos. Formas jóvenes (progranulocitos e incluso mieloblastos) son comunes en niños jóvenes (menos del 10%).
4. Hay una definitiva "fase linfocítica" (20-50%), la cual empieza en el segundo mes, pero es mayor

entre el primer y el tercer año de la vida.

5. Después de los tres a cinco años de edad, la médula ósea ofrece un cuadro muy semejante al del adulto.
6. Los plasmacitos y los monocitos son más frecuentes en la médula normal de los niños que en los adultos.

En condición de enfermedad, debe recordarse que el cuadro medular en niños es mucho más lábil que en los adultos y que grandes variaciones son posibles en respuestas a infecciones.

Al mielograma porcentual señalado, se debe adjuntar lo que suele llamarse como mielograma descriptivo y que en líneas anteriores se ha explicado. En este último análisis se hace una descripción de cada una de las series mieloides. En general, se deben indicar las siguientes características referentes a la técnica de la punción:

1. Sitio.
2. Características de la punción.
3. Volumen extraído.
4. Aspecto del producto extraído.

JUSTIFICACIONES PARA REALIZAR EL ANÁLISIS DE MÉDULA ÓSEA (Cuadro N° 7)

El análisis de la médula ósea está indicando en:

1. Anemias macrocíticas-megaloblásticas.
2. Evidencias clínicas de discrasias sanguíneas (en caso de linfadenopatías inexplicables, esplenomegalia, hepatomegalia, etc.).
3. Casos de anemia, trombocitopenia o leucopenia inexplicables. En toda pancitopenia.
4. Hallazgos de sangre periférica que sugieren leucemia (anemia, trombocitopenia, etc.).
5. Evidencia radiológica de lesiones óseas causadas posiblemente por discrasias sanguíneas.
6. Carcinomas, con o sin evidencia radiológica de metástasis.
7. Para identificar parásitos, a veces encontrados en médula ósea (Leishmania, histograma, Plasmodium, Trypanosoma).
8. Investigación bacteriológica e histológica de granulomas.
9. Anemias por deficiencia de hierro (para estimar el contenido de hierro en médula).
10. Antes de una esplenectomía para determinar el estado funcional de la médula ósea.
11. Para el diagnóstico de las enfermedades por almacenamiento de lípidos (Gaucher, Niemann Pick, etc.).
12. Para evaluar terapias en anemias, leucemias y otros, o ante sospecha de recaídas.

Cuadro N° 7. Estudio de la médula ósea: valor del mielograma

1. **Diagnóstico** de enfermedades hematológicas y no hematológicas.
2. **Corroborar** los diagnósticos hechos en sangre periférica.
3. **Aclarar** los diagnósticos cuando la sangre periférica no es concluyente.
4. **Define citopenias y anemias sin reticulocitos**
5. **Califica** la maduración de las líneas hematopoyéticas y destaca la displasia y la neoplasia.
6. **Define** claramente el estado de las reservas de hierro.
7. **Evalúa** resultados del tratamiento antineoplásico.

El examen de médula ósea generalmente no es de gran ayuda en:

1. Anemias hemolíticas (no asociadas a leucemias o linfomas).
2. Leucemia linfocítica crónica (los análisis histológicos de los nódulos linfáticos son más satisfactorios).

Cabe destacar que el análisis de la médula ósea está contraindicado en hemofílicos y en otros desórdenes hemorrágicos relacionados.

PATRONES MEDULARES CLÁSICOS EN DIVERSAS HEMOPATÍAS

Patrón normal: celularidad normal; maduración normal de todas las líneas celulares; proporción de granulopoyesis sobre eritropoyesis (razón G:E) = 3,5 (promedio).

Eritropoyesis

1. Incrementada a base de eritroblastos tardíos (policromatófilos y ortocromáticos); ejemplo: anemia de la hemorragia aguda.
2. Parcialmente incrementada o parcialmente inconspicua. Ejemplo: anemia por deficiencia de hierro sin un componente regenerativo o en anemia debida a infección (el diagnóstico diferencial: depósitos de hierro).
3. Francamente incrementada, con buena maduración: típica de anemia hemolítica no complicada.
4. Aumentada con desviación madurativa a la izquierda (aumento de eritroblastos, basófilos). Ejemplo: anemia sideroblástica (muchos sideroblastos anulares patológicos).
5. Francamente incrementada con desviación madurativa a la izquierda, con abundantes megaloblastos, gigantismo en metamielocitos, bandas y segmentados; cuerpos de Howell Jolly. Ejemplo: anemia megaloblástica (típico ejemplo de diserieitropoyesis).
6. Incrementada con moderada desviación a la izquierda, frente a una citopenia periférica refractaria a tratamiento. La eritropoyesis presenta cambios displásicos, esto da un cuadro variable de panmielopatía hiperplásica dishemopoyética: síndromes mielodisplásicos ("anemia refractaria", preleucemia).
7. Degeneración maligna de la eritropoyesis; con eritroblastos anormales -algunos poliploides-PAS positivos: enfermedad y síndrome de Di-Guglielmo.
8. Ausencia de eritropoyesis: anemia aplásica, como síntoma parcial de una panmielopatía o única, como parámetro diagnóstico de aplasia pura de serie roja.

En el Cuadro N° 8 se indican los diferentes tipos de eritropoyesis existentes.

Cuadro N° 8. Médula ósea: tipos de eritropoyesis

1. **Normal:** normoeritroblástica.
2. **Microeritroblástica:** anemia ferropriva y talasemias.
3. **Sideroblástica:** primaria y secundaria.
4. **Megaloblástica:** carencia o autoinmune.
5. **Displásica:** síndromes mielodisplásicos (SMD) y eritroleucemia.
6. **Aplásica:** anemia aplásica, aplasia pura de serie roja y crisis aplásicas.
7. **Hiperplásica - mieloproliferativa (autónoma):** policitemia vera.
8. **Hiperplásica - reactiva:** hemólisis crónica, sangrado, tratamiento específico.
9. **Diserieitropoyética congénita** (tipos I a IV).

Granulopoyesis

1. Incrementada, con predominio de formas maduras. En sangre periférica, leucocitosis con desviación a la izquierda. Ejemplo: infecciones piógenas, necrosis, enfermedad de Hodgkin.
2. Incrementada, a base de formas maduras, eosinófilas: típica de trastornos alérgicos o síndrome hipereosinófilico
3. Fuertemente incrementada con desviación a la izquierda (predominio de mielocitos; altos los eosinófilos y basófilos). Típico de la leucemia granulocítica crónica. En sangre periférica: exagerada leucocitosis leucemoide.
4. Incrementada, con marcada desviación a la izquierda: MO progranulocítica típica de la agranulocitosis.
5. Desplazada por infiltración blástica; cualquier tipo de leucemia aguda.

6. Incrementada, con aumento de formas jóvenes y displasia global de la granulopoyesis: síndromes mielodisplásicos.

Trombopoyesis

1. Normalmente se observa un megacariocito en cada 4-6 campos de 100 x (1 a 5 por cada 1.000 células medulares).
2. Incrementada: PTI (con formas inmaduras), leucemia granulocítica crónica; en general, en síndromes mieloproliferativos y mielodisplásicos. En estos últimos suele ser ineficaz.

Plasmacitosis

1. Reactiva: típica de enfermedades disproteinémicas o inflamatorias; infección.

2. Neoplásica: infiltración de células plasmáticas mielomatosas: mieloma múltiple.
3. Aumento relativo: anemia aplástica (panmieloptosis).

Histiocitosis tesaúrmica

1. Hiperplasia de células histiocíticas que acumulan lípidos de diversa naturaleza y por diversos mecanismos: enfermedades o síndromes de Gaucher, Niemann-pick, Hand-Schüller-Christian, histiocitosis azul marino. También en daño medular tóxico.

Histiocitosis hemofagocitante

1. De tipo reactivo en infecciones (especialmente virales) y neoplásico en la histiocitosis medular maligna.
2. Reticulosis maligna.
3. Proliferación de células reticulares y de estirpe tumoral. Ejemplo: Sarcoma de Ewing.

Médula infiltrada por tumor (mieloptosis)

Diversos patrones, usualmente sinciales, de metástasis de cáncer de tiroides, próstata, estómago, mama, entre otros.

Linfopoyesis

1. Normalmente se ve menos de 15% de linfocitos en MO de adultos. Ellos derivan de la sangre periférica y de folículos linfáticos de la propia MO, lo que da una imagen local o focal de su infiltrado.

2. Aumentada: enfermedades inmunológicas e infecciosas.
3. Aumento relativo: aplasia medular.
4. Aumentada: por infiltración o metaplasia, a base de linfocitos maduros, los cuales progresivamente desplazan la hemopoyesis normal (leucemia linfocítica crónica).
5. Aumentada: por infiltración en MO de linfocitos, células plasmáticas y cebadas; típico de la macroglobulinemia de Waldenström (inmunocitoma linfoplasmacitoide).
6. Aumentada por infiltración de linfocitos peludos (tricoleucemia) o de linfoma maligno.

CLASIFICACIÓN DEL ESTADO DE LAS RESERVAS DE HIERRO (HEMOSIDERINA)

Las reservas de hierro deben estudiarse en preparaciones adecuadas del material medular, a efecto de poder evaluar tanto en el estroma (hierro tisular o macrofágico) como en el eritrón fijo (sideroblastos). Con experiencia, la calificación será: 1) normal; 2) presente pero disminuida; 3) ausente; 4) hemosiderosis (muy aumentada).

En cuanto el eritrón (normalmente se aprecian pocos granulillos en el 20-50% de los eritroblastos tardíos), la eritropoyesis puede ser sideropénica, sideroblástica o normosideroblástica. Ambas mediciones son indispensables en el abordaje diagnóstico del cuadro anémico en estudio.

En el Cuadro N° 9 se indican los patrones de hierro en médula ósea.

Cuadro N° 9. Patrones de hierro en médula ósea

1. Ausencia de Fe tisular (SMF) y en eritroblastos = ANEMIA FERROPRIVA.
2. Aumentado en SMF y en serie roja: SOBRECARGA de Fe ++ = anemias hemolíticas, anemias refractarias, talasemias, hemocromatosis, post-transfusión, post-terapia parenteral de Fe, anemias megaloblásticas.
3. Aumentado en SMF y disminuido o ausente en serie roja = anemia de la enfermedad crónica.
4. Aumentando en serie roja y disminuyendo el tisular (SMF) = por disminución del estroma mieloide; mielofibrosis y leucemia mieloide crónica.

MÉDULA ÓSEA Y ENFERMEDADES QUE AFECTAN AL SISTEMA MIELOPOYÉTICO

A continuación se resumen los cambios más importantes y característicos que ocurren en la médula ósea (por aspiración y biopsia), en diversas enfermedades que afectan el sistema mielopoyético.

Anemia sideroblástica

La anemia sideroblástica se asocia con anemia hemolítica, mieloma múltiple, enfermedad mieloproliferativa, mielosis eritrémica, desórdenes no hematopoyéticos (hipotiroidismo, tirotoxicosis, poliartritis y enfermedades crónicas) y algunos medicamentos, como la isoniazida y los antibióticos.

La anemia sideroblástica hereditaria, variedad ligada al sexo X, refractaria a la pirodoxina, con médula ósea anormal, suele persistir luego de la terapia con dicho fármaco.

Tanto en la anemia sideroblástica hereditaria como en la adquirida, la médula ósea se caracteriza por una hiperplasia eritroide intensa asociada frecuentemente con desviación a la izquierda. En la forma adquirida son frecuentes eritroblastos policromatófilos que presentan cambios megaloblásticos nucleares. También se reportan eritroblastos microcíticos. Otras anomalías incluyen células binucleadas y picnócitos. El citoplasma aparece vacuolado en muchas células y pobremente hemoglobinizado.

Hemosiderina:

Aumento de hierro en células reticulares y una excesiva granulación siderótica en eritroblastos. Los sideroblastos se presentan en gran número y las células que predominan son las formas tardías. En general, casi todos los eritroblastos muestran un exceso de granulación y en algunas células se observan anillos parciales o con abundante granulación sin formación obvia del anillo.

Anemia de los desórdenes crónicos

En la anemia de los desórdenes crónicos el aspirado es difícil de estudiar, porque el desorden puede originar alteraciones en los patrones y estructuras celulares. En general, la médula ósea es anormal; su relación G:E es de 3:1 o 4:1 y presentan una ligera evidencia de hiperplasia eritroide compensada.

Hemosiderina:

Hay un patrón de almacenamiento en el citoplasma de

macrófagos o en las células nucleadas. Normalmente, se observan partículas positivas para el azul de prusia adyacente o macrófagos y en una tercera parte de las células rojas nucleadas, sideroblastos. Además, como es característico de esta patología, existe un aumento de hierro de depósito (en los macrófagos) y una disminución de sideroblastos.

Las siguientes causas pueden agravar y oscurecer la anemia por enfermedad crónica: anemia por dilución; paciente con enfermedad neoplásica, con aumento de volumen plasmático como mieloma múltiple; macroglobulinemia; drogas que produzcan hemólisis inducida, pérdida de sangre o mala absorción de hierro; fallo renal que genere a la vez un fallo relativo en la médula ósea, por aumento del nitrógeno ureico y de la creatinina (azotemia).

Reemplazo en la médula ósea

Relacionado con metástasis y linfomas.

Estados de sobrecarga de hierro

Cuando hay sobrecarga de hierro se presenta una médula ósea con diseritropoyesis a causa de la ferremia alta.

Hemosiderina:

Se observa una distribución aumentada de depósito a nivel celular, de los macrófagos y en el espacio intercelular, aunque no siempre este examen es del todo útil, solo cuando se ve infiltración a este nivel.

Anemia ferropriva

En la anemia ferropriva existe un aumento de la serie eritroide al defecto de hemoglobinización, pero las alteraciones morfológicas solo se observan a nivel de los eritroblastos maduros. Se presentan también alteraciones de la mitosis y, ocasionalmente, la presencia de eritroblastos binucleados (cierto grado de diseritropoyesis). Además, puede observarse un aumento de los histocitos o macrófagos medulares como respuesta a lo anterior. En deficiencia severa, los eritroblastos pueden ser más pequeños de lo normal: microeritroblastos.

Hemosiderina:

Disminución o ausencia de reservas de hierro, ya que no se observan partículas y hay una disminución en el número de sideroblastos (lo normal es 10% de sideroblastos).

Anemia megaloblástica

En anemia megaloblástica se observa un aspirado hiperplásico con cambios megaloblásticos en los precursores de las series eritroide, mieloide y trombopoyética; la relación G:E es de 1:1. La granulocitopoyesis megaloblástica es más evidente cuando coexiste una infección donde se necesita una buena producción de granulocitos, cuyas reservas están disminuidas en esta patología. Lo típico se observa en las células eritroides, donde se presentan células con núcleos relativamente inmaduros de cromatina laxa; además, pueden observarse de uno a dos nucléolos y un citoplasma abundante en cualquier estadio madurativo, constituyendo la denominada disociación madurativa núcleo-citoplasmática. También es común un alto número de figuras mitóticas.

Hemosiderina:

El hierro en los macrófagos está aumentado, pero hay ausencia de sideroblastos en anillo. Son característicos los metamielocitos y las células en banda gigantes, así como la poliploidía de los megacariocitos.

Anemia hipoplásica y aplásica

En anemia hipoplásica y aplásica la médula ósea presenta aumento de células grasas y un incremento relativo de células linfocíticas, mononucleares, reticulares, mastocitos y células plasmáticas. Lo característico de tal celularidad son grumos entremezclados con células propias de la médula (pocas células mieloides) y ausencia de megacariocitos. El cómputo diferencial es variable y la relación G:E puede encontrarse normal, aumentada o disminuida, por lo que carece de valor diagnóstico. La serie roja está disminuida en número, pero se encuentran todos los estadios de maduración, aunque ciertas células eritroides inmaduras son anormales, megaloblastoides. La biopsia es diagnóstica desde que la hipoplasia es evidente en los cortes histológicos.

Hemosiderina:

Se observa poco hierro citoplasmático en las células nucleadas y pocos gránulos sideróticos dentro y fuera del macrófago.

Biopsia:

Indispensable para el diagnóstico diferencial, con el reemplazo medular por metástasis.

El aumento de células grasas con pobre cantidad de población celular normal, indica una médula hipoplásica.

Diseritropoyesis primaria o hereditaria

La diseritropoyesis primaria o hereditaria significa una eritropoyesis ineficaz, destrucción intramedular y muerte prematura a nivel de eritrocitos circulantes; se indican tres tipos principales:

- a) *Tipo I.* Características de la médula ósea: anormalidad de la serie eritroide con cambios megaloblastoides, células grandes con división incompleta, anomalías en el núcleo (como doble núcleo), puentes internucleares y cromatina.
- b) *Tipo II HEMPAS (hereditary erythroblastic multinuclearity associated with positive acidified serum test).* Eritroblastos policromatófilos y ortocromáticos que contienen de dos a siete núcleos de apariencia normal.
- c) *Tipo III.* Eritroblastos gigantes > 50 fm. Con una prominente basófila.

Hiperesplenismo primario

La médula ósea es esencial para excluir otras causas hematológicas de citopenia. En hiperesplenismo primario se observa una médula hiperplásica con predominio de precursores celulares jóvenes.

Aplasia pura de la serie roja

La médula ósea es de importancia para el diagnóstico de la aplasia pura de la serie roja; en esta se presenta una alteración en la celularidad medular con una profunda hipoplasia eritroide y una alta relación G:E. Las pocas células rojas que se observan son jóvenes con cambios nucleares sugestivos de megaloblastosis. La morfología y la secuencia de maduración de la serie mieloide y de megacariocitos son normales, al igual que las células plasmáticas y mononucleares. Es frecuente un aumento de eosinófilos y células similares a linfocitos.

Síndromes mielodisplásicos

En síndromes mielodisplásicos la celularidad de la médula es usualmente normal o aumentada, rara vez se reporta disminuida y puede ser similar a una anemia hipoplásica con algunas islas de hemopoyesis. La hiperplasia eritroide es frecuente con eritroblastos grandes o pequeños, fragmentación nuclear y pobre hemoglobinización, con evidencia de diseritropoyesis y sideroblastos en anillo. Se presentan anomalías en granulocitos (los metamielocitos y los neutrófilos están hipogranulares o granulares); pseudo Pelger-Hüett; neutrófilos hipersegmentados y neutrófilos poliploides. También se presentan defectos en los

megacariocitos, con formas mono y binucleadas o con núcleos enanos. Los síndromes mielodisplásicos avanzados pueden presentar un aumento de células blásticas, pero en un porcentaje menor a 20%. El hierro en los macrófagos se encuentra aumentado.

Anemia hemolítica hereditaria

En la anemia hemolítica hereditaria se observa una hiperplasia; la relación leucoeritroblástica que normalmente es de 3:1 llega a ser de 1:1; desaparece la grasa y aumenta el volumen medular, con incremento del número de células nucleadas inmaduras; se presentan eritroblastos policromatófilos, aunque en pacientes con alto grado de hemólisis el predominio es de eritroblastos basófilos.

Histiocitosis

1. *Enfermedad de Gaucher*: a nivel de médula ósea se observan las células vacuoladas, espumosas (la célula de Gaucher). Son histiocitos de 20-80 fm de diámetro, con un núcleo picnótico, excéntrico, único o múltiple y cuyo citoplasma ofrece un aspecto diferente, según la cantidad de glucocerebrósido almacenado, dando una imagen de papel pergamino o seda, arrugada.
2. *Niemann Pick*: se presenta la célula típica de un tamaño de 20 a 100 fm, con citoplasma espumoso y que da la impresión de pequeñas gotas; son células PAS positivas.
3. *Gangliosidosis tipo I*: se encuentran células espumosas y linfocitos con vacuolización.
4. *Histiocito azul marino*: a nivel medular se observan abundantes histiocitos azul marino entremezclados con una celularidad hematopoyética normal.

Síndromes linfoproliferativos crónicos

1. *Leucemia linfocítica crónica (LLC)*: reemplazo de los elementos normales de la médula ósea por linfocitos maduros en un 40- 95% del total de las células; se considera para el diagnóstico un índice infiltrativo superior al 40%. El número de células eritroides y mieloides se encuentra disminuido; al presentarse anemia hemolítica se establece una hiperplasia eritroide. Biopsia: infiltración linfoide con un patrón difuso a nodular; estos linfocitos son de tamaño pequeño a mediano, de carácter maduro.
2. *Linfoma bien diferenciado*: se presenta un patrón similar; la diferencia se basa en la linfocitosis absoluta en sangre periférica (5×10^9 linfocitos

por litro) y porque en las biopsias el infiltrado linfocitario es usualmente difuso en la LLC y focal en este linfoma.

3. *Leucemia de células peludas*: presenta una médula ósea con infiltrado difuso y reemplazo del tejido normal. Las células son similares a las de un proceso linfoproliferativo, de un tamaño mediano a grande, en cuyo citoplasma, que es abundante con aspecto moteado típico, se observan proyecciones de aspecto piloso con un color grisáceo azulado que le da un aspecto irregular. Su núcleo es redondo u oval y situado excéntricamente; su cromatina es laxa; rara vez presenta nucléolos. Biopsia: es esencial. El aspirado indica un aumento de fibras de reticulina, lo cual dificulta su toma. El infiltrado celular presenta células con núcleo oval, enlogado e indentado vesicular.
4. *Síndrome de Sézary*: la médula ósea no se afecta y se observa bien conservada aun en períodos avanzados de la enfermedad. La célula de Sézary presenta un núcleo de aspecto cerebriiforme, es de origen T, y pueden llegar a observarse en sangre periférica y biopsia de piel.
5. *Linfomas*: la médula ósea es un examen integral; menos del 10% la compromete de forma temprana. Se ha demostrado un porcentaje de infiltración del 15% al 69%, de los cuales el linfoma linfocítico pobremente diferenciado nodular (células pequeñas hendidas) infiltra más que el linfoma linfocítico poco diferenciado (LLPD) difuso. El LLPD folicular presenta un patrón focal. El linfocítico bien diferenciado presenta una alta incidencia de células grandes hendidas y no hendidas, y el linfoma indiferenciado difuso (células pequeñas no hendidas) muestra un patrón difuso. En la biopsia el LLPD y el linfoma Hodgkin (LH) muestran una considerable variación celular.

Enfermedad Hodgkin

El diagnóstico se hace con la identificación de la célula de Reed Sternberg; además, la fibrosis difusa, la aplasia medular y la hiperplasia granulocítica no específica son hallazgos inespecíficos encontrados en esta enfermedad.

Biopsia

La presencia de áreas focales o difusas y un infiltrado no específico de linfocitos, histiocitos, células plasmáticas y eosinófilos sugieren el diagnóstico de la enfermedad de Hodgkin. También se ha reportado necrosis medular; y por medio de la tinción de reticulina

se ha demostrado cierto grado de fibrosis reticular y de colágeno.

Mononucleosis

En mononucleosis hay hiperplasia de elementos mononucleares y la presencia de linfocitos atípicos (estimulados).

Síndromes mieloproliferativos crónicos

1. *Leucemia mieloide crónica (LMC)*: presenta una marcada hiperplasia de la serie granulocítica y una relación G:E disminuida; es frecuente una ligera desviación hacia la izquierda en la curva de maduración con predominio de mielocitos y metamielocitos. Generalmente, también están aumentados los basófilos y eosinófilos, así como los megacariocitos, con cierto poliformismo. El examen de médula ósea es de poco valor diagnóstico, aunque sí de interés para descartar mielofibrosis. Biopsia: presenta un patrón similar y es de importancia para determinar fibrosis. Hay aumento de fibras de reticulina o una extensiva fibrosis de colágeno. En LMC agresiva se ha reportado necrosis medular. En la fase de transformación aparece una imagen medular similar a la de una leucemia aguda de novo.
2. *Metaplasia mieloide (mielofibrosis primaria)*: se caracteriza por una médula ósea panhiperplásica (todos los elementos medulares), con una fibrosis reticular que va desde la mínima hasta el completo reemplazo de médula por tejido fibrótico denso. En la biopsia se presentan tres patrones: la condición hiperplásica, que se refiere a la fase celular de la mielofibrosis, donde los megacariocitos hiperplásicos aparecen como células polimórficas grandes, con un aumento de fibras de reticulina, pero sin mielofibrosis intensa. El segundo patrón revela áreas mixtas de fibrosis y de hiperplasia, con disminución de elementos eritroides y mieloides; la fibrosis presenta fibras de reticulina y colágeno. El tercero es la mielofibrosis extensa (y osteoesclerosis), donde los elementos medulares están disminuidos, excepto los megacariocitos, que se presentan en grumos dentro del parénquima y los sinusoides. Las trabéculas osteoescleróticas pueden ser ocupadas en más de un 30%.
3. *Policitemia vera*: se caracteriza por una médula ósea hiper celular, hiperplásica y una relación de 1:1 o a favor de la serie eritroide; los megacariocitos se encuentran elevados con formas gigantes o poliploides; los eosinófilos y los basófilos están

aumentados con formas grandes gigantes o poliploides; se presenta un número aumentado de megacariocitos y una prominente hiperplasia granulocítica. Hemosiderina: los depósitos se encuentran depletados o ausentes. Biopsia: es de valor para distinguir la policitemia secundaria, donde la granulopoyesis y la trombopoyesis es normal (megacariocitos son normales en número y tamaño). Por lo general, el hierro está presente; este hallazgo difiere del patrón de la policitemia primaria.

Mieloma múltiple

Revela la proliferación plasmocitaria que aparece bajo la forma de plasmocitos mielomatosos en un porcentaje elevado, con anomalías celulares: células binucleadas, figuras mitóticas, vacuolización nuclear y citoplasmática (células de Mott) y nucléolos prominentes. Biopsia: es importante para el diagnóstico la demostración de plasmocitosis, la cual se establece cuando hay generalmente más de un 30% de células plasmáticas, aunque en ciertos casos pueden encontrarse hasta un 50% de este tipo de células y en otros valores más bien menores, pero de inmunofenotipo maligno. Entonces se recurre a observar si el arreglo de las células plasmáticas se encuentra en pequeños grupos o nódulos, en áreas peritrabeculares. La apariencia citológica anormal de estas células, así como una alta relación núcleo-citoplasma, asincronismos, la evidencia de aumento osteoblástico, osteoclástico y la característica de monoclonalidad que se detecta por citometría de flujo, demuestran la naturaleza neoplásica de la serie. Se complementa su estudio con los patrones de proteínas e inmunoglobulinas.

Macroglobulinemia de Waldenström

Proliferación generalizada de linfocitos (20-100%), plasmocitoides y de células plasmáticas maduras sin anomalías morfológicas (cuyo porcentaje no sobrepasa al 10%). Estos hallazgos pueden originar un patrón que no difiere de un LLC. En menos del 5%, la infiltración plasmocitaria medular es masiva y algunas veces francamente distrófica; se han reportado mastocitos aislados, eosinofilia y presencia de vacuolas intranucleares o intracitoplasmáticas en células linfoides (PAS+). Se complementa el estudio con la demostración de pico monoclonal de IgM.

Otras plasmacitosis

1. *Enfermedad de Franklin (enfermedad de cadenas pesadas gamma)*: médula ósea con aumento de células linfoplasmocitoides, células plasmáticas, linfocitos, eosinófilos y macrófagos. Se ha reporta-

do en ciertos casos una médula normal, sin alteraciones evidentes.

2. *Plasmocitosis reactiva*: se observa un aumento de células plasmáticas de aspecto normal, sin alteraciones morfológicas, que se asocia con enfermedades hepáticas (como cirrosis) y enfermedades del colágeno, entre otras. El proteinograma es policlonal.

Metástasis tumoral

Revela la presencia de grupos de células tumorales, de carcinoma de próstata, tiroides, mama, pulmón, neuroblastoma u otro tipo de célula tumoral que infiltre a este nivel. Se practica biopsia medular. Se confirma el carácter neoplásico de esta célula de poco citoplasma, de márgenes indistintos, núcleos intensamente basófilos, rodeado de un material acidófilico de aspecto gelatinoso, y se busca definir su origen.

Púrpura trombocitopénica idiopática inmune (PTI)

Se aprecia hiperplasia megalocariocítica en diversos estadios de maduración.

Púrpura trombocitopénica inducida por drogas

Puede presentar el mismo aspecto morfológico de la PTI. Ningún otro elemento mielopoyético se observa afectado.

Enfermedades no neoplásicas que alteran los leucocitos

El estudio de la médula ósea es de gran valor para excluir otras enfermedades o para confirmar un diagnóstico.

1. *Agranulocitosis debida a drogas o químicos*. Hay agranulocitosis sin anemia o trombocitopenia. Se observa un aumento relativo de linfocitos y monocitos. Los plasmacitos pueden estar aumentados. El análisis de médula ósea puede no ser necesario para hacer el diagnóstico.

Por lo general, la serie granulocítica se encuentra reducida, por lo que la relación G:E tiende a disminuir. El tipo de células mieloides que predominará depende de la duración, acción y potencia del agente causal. El primer cambio que ocurre es la reducción del número de elementos maduros con predominio de los estados más inmaduros. Si el agente continúa actuando, desaparecerán los metamielocitos, luego los mielocitos y finalmente, los progranulocitos. Las plasmacélulas, las formas jóvenes de la serie linfocítica y las células reticulares pueden estar aumentadas. Si el agente ofensor es eliminado y la médula no fue lesionada seriamente, la actividad medular vuelve a su estado normal.

2. *Leucopenia, neutropenia, linfocitosis, linfocitosis atípica, reacciones leucemoides y eosinofilia*. Estos cambios pueden ocurrir sin anemia o trombocitopenia. El estudio de la médula ósea se hace para descartar leucemia.

A modo de resumen, en el Cuadro N° 10 se muestran las anormalidades que pueden encontrarse en la médula ósea.

Cuadro N° 10. Clasificación de las anormalidades que pueden estar presentes en la médula ósea

I. Anormalidades cualitativas:

- Mieloma.
- Displasia megaloblástica y mielodisplasia refractaria.
- Enfermedades de depósito: Gaucher, Niemann-Pick, Hand-Schuller-Christian, etc.
- Células de lupus eritematoso (células LE).
- Células tumorales.
- Células de Linfoma.
- Granulomas (tuberculosis, brucelosis, mononucleosis infecciosa).
- Parásitos (malaria, Leishmania, Trichinella).
- Bacterias y hongos.
- Vacuolización de normoblastos en toxicidad por medicamentos.
- Vacuolización de normoblastos en fenilcetonuria.
- Amiloidosis.
- Tejido necrótico (tumor, necrosis o infarto isquémico).

Cuadro N° 10. Clasificación de las anomalías que pueden estar presentes en la médula ósea

II. Anomalías cuantitativas:

- Hiperplasia:
 - ✓ Generalizada:
 - Síndromes mieloproliferativos y mielodisplásicos.
 - Reacción a pancitopenia; sida; hiperesplenismo.
 - ✓ Selectiva:
 - Linfocítica:
 - a. Leucemia linfocítica.
 - b. Mononucleosis infecciosa.
 - c. Linfocitosis infecciosa.
 - d. Infecciones virales varias.
 - e. Reacción leucemoide linfocítica.
 - f. Linfomas.
 - g. Relativa por disminución de otras líneas celulares.
 - Granulocítica:
 - a. Infección.
 - b. Leucemia mielocítica crónica.
 - c. Reacción leucemoide (síndromes mieloproliferativos).
 - d. Relativa por disminución de otras líneas celulares.
 - Monocítica:
 - a. Leucemia monocítica y mielomonocítica.
 - b. Relativa por disminución de otras líneas celulares.
 - Plasmática:
 - a. Mieloma múltiple.
 - b. Artritis reumatoide.
 - c. Estados de hipersensibilidad.
 - d. Sífilis.
 - e. Cirrosis hepática.
 - f. Enfermedades de Hodgkin.
 - g. Macroglobulinemia de Waldeström.
 - h. Amiloidosis.
 - i. Tumores malignos.
 - j. Enfermedad de Weber-Christian.
 - k. Colitis ulcerativa.
 - Eritroblástica:
 - a. Pérdida de sangre.
 - b. Anemias hemolíticas.
 - c. Anemia por deficiencia de hierro.
 - d. Mielodisplasia y M6.
 - e. Anemia megaloblástica en tratamiento.
 - f. Síndrome mieloproliferativo, fase eritrocítica.
 - g. Relativa por disminución de otras líneas celulares.
 - Megacariocítica:
 - a. Trombocitopenias.
 - b. Síndromes mieloproliferativos, tipo megacariocítico; algunos síndromes mielodisplásicos.
 - Histiocítica:
 - a. Rubéola congénita.
 - b. Infección bacteriana.
 - c. Infección parasitaria.

Cuadro N° 10. Clasificación de las anomalías que pueden estar presentes en la médula ósea

- d. Enfermedad de Karyasur-Forest.
- e. Linfomas.
- f. Hemofagocitosis.
- Mastocitos:
 - a. Enfermedad de mastocitos (mastocitosis sistémica).
 - b. Osteoporosis de la edad.
- Hipoplasia:
 - ✓ Generalizada:
 - Mielofibrosis.
 - Mieloesclerosis.
 - Osteoporosis.
 - Causada por agentes mielotóxicos (químicos, radiaciones ionizantes, etc.).
 - Causada por tumores u otras infiltraciones.
 - Infecciones virales (rubeola, dengue, etc.).
 - Fisiológica en los ancianos.
 - Idiopática.
 - Mielodisplásica (rara).
 - ✓ Selectiva:
 - Granulocítica:
 - a. Agranulocitosis.
 - b. Radiación ionizante.
 - c. Relativa.
 - Eritroblástica.
 - Megacariocítica:
 - a. Púrpura trombocitopénica aplásica.
 - b. Envenenamiento por benzol.
 - Plasmacítica en agammaglobulinemia

BIBLIOGRAFÍA

Albritton E (editor). Standard values in blood. Philadelphia: W.B. Saunders Co.; 1953.

Bain BJ, Lewis SM. Preparation and staining methods for blood and bone marrow films. En: Lewis SM, Bain BJ, Bates I (editores). Dacie and Lewis practical hematology. 9 ed. Edimburgo: Churchill Livingstone; 2001.

Erslev AJ, Gabuzda TG. Hematología aspectos fisiopatológicos. 2 ed. México: Interamericana; 1981.

Hoffbrand AV, Lewis SM. Postgraduate hematology. 2 ed. London: William Heinemann Medical Books Ltd.; 1981. p. 60-71, 130-135.

Krause JR. Visión global de la médula ósea. En: Rodak FB. Hematología, fundamentos y aplicaciones clínicas. 2 ed. Argentina: Editorial Médica Panamericana S.A.; 2005. p. 187-198.

Lewis SM. Erythropoiesis. En: Hoffbrand AV, Lewis SM. Postgraduate hematology. 2 ed. London: William Heinemann Medical Books Ltd.; 1981. p. 1-34.

Lichtman MA. Hematología clínica. México: Interamericana; 1983.

Miale JB. Laboratorie medicine hematology. 6 ed. St. Louis: C.V. Mosby Co.; 1982. p. 116-349.

Sáenz GF (editor). Hematología analítica. 5 ed. San José: EDNASSS; 2008.

San Sabrafen J. Hematología clínica. Madrid, España: Ediciones Hartcourt S.A.; 2001.

Williams W, Beutler E, Kipps TJ, Coller BS Casascelli C. Williams: hematology. 6 ed. Reimpresión. Madrid: Marbán Libros S.L.; 2007.

TRASPLANTE DE CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS

*Dra. María Rodríguez Sevilla
Dr. Luis F. Vásquez Castillo
Dr. Willem Buján Boza
Dra. Priscilla Orlich Pérez*

INTRODUCCIÓN

El trasplante de células madre hematopoyéticas (CMH) consiste en la sustitución de la hematopoyesis de una persona enferma por la de un donador, mediante la introducción de células madre hematopoyéticas al organismo.

Los primeros estudios relacionados con el trasplante de CMH fueron publicados en 1957 por el profesor Donald Thomas; pero no fue sino hasta 1968, con el desarrollo del conocimiento del complejo mayor de histocompatibilidad y de las medidas de soporte necesarias en el paciente aplásico, que se logró realizar el primer trasplante exitoso en un niño con inmunodeficiencia congénita, con su hermano HLA idéntico como donador. A partir de entonces, diversos grupos han desarrollado la técnica del trasplante de células madre y en la actualidad es un procedimiento que se utiliza extensamente y constituye la mejor opción terapéutica en el tratamiento de numerosas enfermedades hematológicas, inmunológicas y metabólicas.

En Costa Rica el primer trasplante de CMH se realizó en 1985, a un niño con inmunodeficiencia combinada grave (en el presente es un adulto normal). Después de este evento, el procedimiento se ha aplicado en el tratamiento de malignidades hematológicas e inmunológicas, y se realiza en tres hospitales de la Caja Costarricense de Seguro Social (CCSS).

El trasplante se utiliza con distintos propósitos dependiendo del paciente, de la enfermedad y del tipo de trasplante, que puede ser autólogo, alogénico o singénico; este último se refiere al trasplante de CMH de un gemelo idéntico y su efecto resulta muy similar al del trasplante autólogo, debido a que el donador y el receptor comparten el mismo sistema inmunológico.

PROCEDIMIENTO

Trasplante autólogo

El trasplante autólogo de CMH es un procedimiento que “rescata” al paciente del efecto de dosis altas de quimioterapia o radioterapia, reconstituyendo la hematopoyesis mediante una infusión de CMH del mismo paciente, recolectadas en una etapa previa. Se utiliza en personas con enfermedades malignas sensibles a la quimioterapia y/o la radioterapia. Cuando la toxicidad que limita la dosis de quimioterapia o radioterapia es la toxicidad medular, el extraer una cantidad suficiente de células madre hematopoyéticas y preservarlas permite evitar el efecto del tratamiento en ellas.

Así, la primera etapa se conoce como **movilización y criopreservación** (Figura N° 1). En esta se le aplican al paciente factores estimuladores y/o quimioterapia que ayude a estimular la producción y la liberación de las CMH a la circulación. Mediante aféresis se recolectan las células y posteriormente se les agrega una solución crioprotectora que permita conservarlas a temperaturas inferiores a los -60 °C y mantener su viabilidad durante tiempos prolongados. También podría recolectarse las CMH de la médula ósea mediante punciones repetidas bajo anestesia general, sin utilizar previamente factores de crecimiento ni quimioterapia.

Cuando se logra obtener la suficiente cantidad de células progenitoras criopreservadas, el paciente puede pasar a la etapa del **acondicionamiento y trasplante** (Figura N° 2). En este momento el paciente recibe dosis altas de quimio y/o radioterapia y luego recibe las células recolectadas en la etapa previa. Esto le permite al paciente recuperarse rápidamente del efecto del tratamiento y disminuir los riesgos derivados de una aplasia muy prolongada.

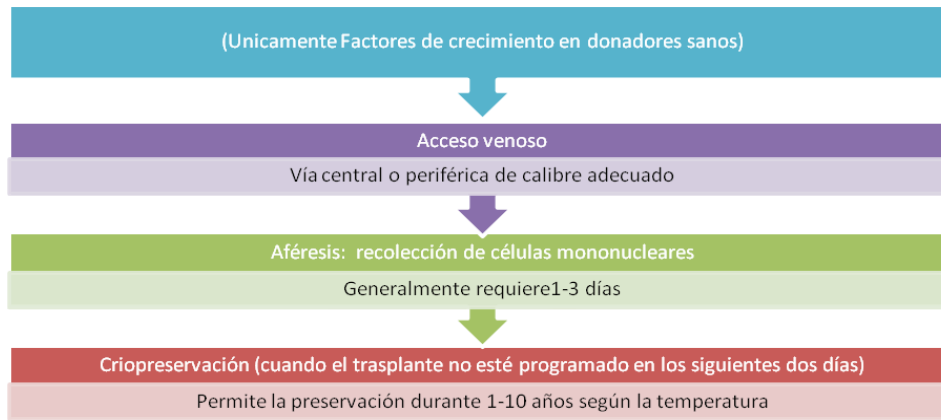


Figura N° 1. Etapas de la recolección de células madre de sangre periférica.

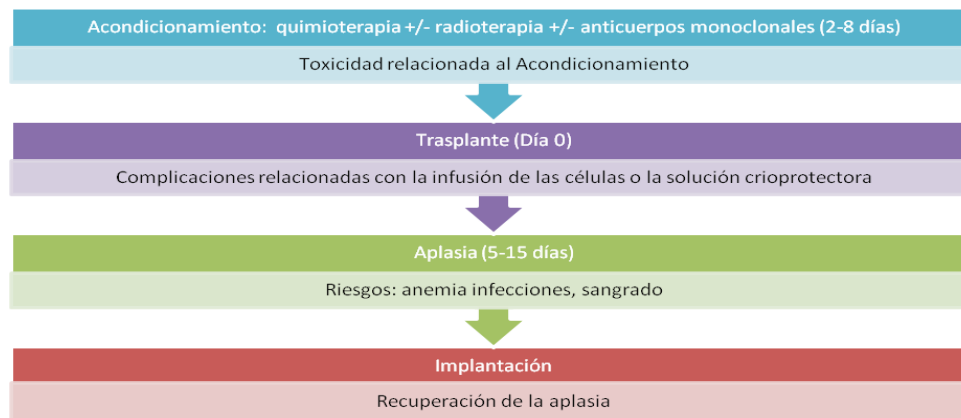


Figura N° 2. Fases del trasplante de células madre hematopoyéticas.

Trasplante alogénico

El trasplante alogénico de CMH consiste en la reconstitución hematológica de un paciente utilizando células hematopoyéticas de un donador sano, que puede ser un familiar (por ejemplo, un hermano) o un donador no relacionado. El objetivo del trasplante no solo es reducir el tiempo de aplasia y los riesgos derivados de ella, sino que adicionalmente se utiliza para:

- γ Restituir la hematopoyesis, un sistema inmunológico o funciones metabólicas deficientes, ya sea por patologías congénitas o adquiridas.
- γ En enfermedades neoplásicas se reconoce un efecto llamado injerto vs tumor derivado del efecto de las células inmunes trasplantadas y que contribuye al potencial curativo del procedimiento.

Este tipo de trasplante inicia con el acondicionamiento, donde se le aplica al paciente quimioterapia, anticuerpos

monoclonales, inmunosupresores y/o radioterapia de dosis alta o reducida, según la condición del paciente y el tipo de enfermedad. De esta manera se logra aplicar un tratamiento contra la enfermedad maligna, si fuera el caso, y al mismo tiempo se crea un espacio en la médula ósea para que se pueda desarrollar el injerto. Adicionalmente, se inmunosuprime al paciente receptor para evitar el rechazo del injerto; el efecto de la inmunosupresión permite, más adelante, prevenir la enfermedad injerto vs huésped (Ivsh) y permite el desarrollo de tolerancia por parte de las células trasplantadas.

El día del trasplante se transfunde por una vía de acceso venoso las CMH del donador. Una dosis suficiente de CMH es fundamental para asegurar una correcta implantación. La recuperación del número de neutrófilos y de plaquetas se debe dar alrededor de 7 a 21 postrasplante. En aquellos trasplantes en los que se utilizan dosis reducidas en el acondicionamiento, es probable que la aplasia sea menos profunda y menos duradera.

El Cuadro N° 1 resume las indicaciones actuales tanto para el trasplante autólogo de CMH, como para el

trasplante alogénico de células madre de un donador compatible.

Cuadro N° 1. Indicaciones estándar para trasplante de células madre hematopoyéticas	
Trasplante alogénico con donador compatible	Trasplante autólogo
Leucemia aguda no linfocítica de riesgo intermedio o alto en primera remisión.	Leucemia aguda no linfocítica de riesgo intermedio en primera remisión.
Leucemia aguda no linfocítica en segunda o posterior remisión o con enfermedad mínima persistente.	Leucemia promielocítica aguda en segunda remisión.
Leucemia linfocítica aguda de alto riesgo en primera remisión.	Linfoma difuso de células grandes quimiosensible después de la primera recaída.
Leucemia linfocítica aguda en segunda remisión o en recaída incipiente.	Linfoma de células del manto en primera remisión o posterior.
Leucemia mieloide crónica en primera fase crónica sin respuesta a inhibidores de tirosin quinasa.	Linfoma folicular quimiosensible después de la primera recaída.
Leucemia mieloide crónica en fase acelerada o en segunda fase crónica.	Linfoma de Hodgkin quimiosensible después de la primera recaída.
Mielofibrosis de alto riesgo.	Mieloma múltiple.
Síndrome mielodisplásico de alto riesgo.	Tumores de células germinales como tercera línea de tratamiento.
Leucemia linfocítica crónica de alto riesgo.	Sarcoma de Ewing.
Anemia aplásica severa.	Neuroblastoma.
Hemoglobinuria paroxística nocturna.	
Talasemia.	
Drepanocitosis.	
Anemia de Fanconi.	
Anemia de Blackfan-Diamond.	
Enfermedad crónica granulomatosa.	
Enfermedad de Kostman.	

EFEECTO INJERTO VERSUS MALIGNIDAD

En el trasplante alogénico de CMH el efecto antitumoral no se deriva únicamente del régimen de acondicionamiento; también se produce una respuesta inmunológica proveniente de las células del donador contra las células tumorales (leucémicas, linfomatosas, etc.). Este efecto es más evidente en algunas enfermedades como la leucemia mieloide crónica, la leucemia aguda no linfocítica o la leucemia linfocítica crónica, y es menos significativo en la leucemia linfocítica aguda. El efecto injerto vs tumor requiere la activación de células presentadoras de antígeno, lo cual se intenta generar con el régimen de

acondicionamiento. Esto a su vez produce la activación de las células T, de ahí el efecto de subpoblaciones de linfocitos T y NK contra la enfermedad maligna.

El efecto injerto vs malignidad, sin embargo, está estrechamente relacionado con el desarrollo de la enfermedad Injerto vs huésped (Ivsh). Esta, por su parte, es una complicación potencialmente fatal derivada del trasplante. En gran medida se relaciona con la compatibilidad entre el donante y el receptor; de ahí que el mejor conocimiento del sistema HLA (Antígeno Leucocitario Humano) ha sido precisamente el que ha permitido el desarrollo de las distintas técnicas de trasplante de CMH.

TRASPLANTE ALOGÉNICO DE CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS Y COMPATIBILIDAD

Entre los principales factores necesarios para lograr un trasplante exitoso, se encuentra el injerto del sistema inmunológico del donador en el receptor y, al mismo tiempo, el desarrollo de tolerancia por parte del receptor. El desarrollo de ambos efectos depende de la compatibilidad entre el donador y el receptor, lo cual está definido por los genes del sistema HLA, ubicados en el complejo mayor de histocompatibilidad.

Una de las funciones más importantes del sistema HLA es el reconocimiento de antígenos propios y no propios y la presentación antigénica a los receptores del linfocito T en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad. El grado de compatibilidad de los alelos del sistema HLA entre un donador y el receptor se relaciona con el riesgo de complicaciones en el trasplante de CMH.

HLA: genética y biología

El complejo mayor de histocompatibilidad es altamente polimórfico, se encuentra en la superficie de la mayoría de las células y en los humanos es conocido como Sistema Antígeno Leucocitario Humano (HLA, por sus siglas en inglés). Su nombre se debe a que fue identificado y caracterizado utilizando aloanticuerpos contra leucocitos.

El sistema HLA está localizado en el brazo corto del cromosoma 6 (6p21) y se encuentra dividido en tres regiones, denominadas clase I, clase II y clase III. La región que corresponde a clase I se subdivide en HLA-A, HLA-B y HLA-C, genes codificantes por las cadenas pesadas de las moléculas de clase I.

La región clase II posee una serie de subregiones que contienen genes A y B que codifican respectivamente por las cadenas alfa y beta. En esta región se encuentra la familia de los genes DR, conformada por un gen único DRA y nueve genes DRB. Los antígenos específicos de HLA-DR son determinados por el polimorfismo de las cadenas DRB1 codificadas por los alelos DRB1, y la familia de los genes DP y DQ cada uno expresando genes para codificar cadenas alfa y beta.

La región de clase III no codifica moléculas del sistema HLA, pero contiene genes que codifican para componentes del complemento como C2 y C4, así como para factor B, 21-hidroxilasa y factor de necrosis tumoral (FNT).

Las moléculas de histocompatibilidad constituyen un sistema de transporte de antígenos desde el interior de la celular hasta su superficie, en donde son presen-

tados y reconocidos por los linfocitos T y otras células. La respuesta inmune se favorece con el incremento de linfocitos T activados a través del estímulo inducido por la presentación de los antígenos endógenos y exógenos en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad.

La clase I tiene como función presentar péptidos intracelulares a los linfocitos T CD8+, mientras que la clase II presenta a los linfocitos T CD4+ péptidos procedentes de antígenos exógenos que penetran a las células por endocitosis. Por lo tanto, la principal función del sistema es la regulación de la respuesta inmune, mediante la unión con el receptor de las células T durante la presentación antigénica y/o el reconocimiento de lo propio y no propio en el organismo.

Las moléculas de clase I se encuentran presentes en la mayoría de las células nucleadas y plaquetas, con excepción de espermatozoides, glándulas de Brunner duodenales, neuronas del SNC y células trofoblásticas. La expresión de las moléculas clase II está fundamentalmente en células presentadoras de antígenos, como macrófagos, monocitos, células dendríticas del bazo, células epidérmicas de Langerhans o células endoteliales, linfocitos B y células NK; cuando están activados también se encuentran en linfocitos T.

Los genes del sistema HLA poseen una herencia mendeliana. Cada individuo hereda un bloque de genes del complejo mayor de histocompatibilidad del padre y otro bloque de la madre con diferentes alelos; cada bloque de genes heredado de un progenitor es denominado haplotipo. Los dos alelos de cada locus son de expresión codominante, lo que significa que se expresan los tipos de variantes alélicas de cada locus. Por esa razón es que dos hermanos tienen un 25% de posibilidad de ser genéticamente idénticos y un 50% de compartir un haplotipo.

Determinación del sistema HLA

Para la determinación del sistema del HLA se efectúan pruebas serológicas o moleculares con diferente grado de resolución. El adecuado análisis de la molécula de HLA o de sus alelos es de suma importancia porque está relacionado directamente con el éxito o fracaso de una terapia como el trasplante de CMH.

Métodos serológicos: microlinfocitotoxicidad

Este método serológico se basa en la microlinfocitotoxicidad mediada por complemento, y las reacciones se evalúan por el porcentaje de células muertas. Esta técnica fue utilizada desde los inicios del trasplante; sin embargo, gradualmente ha sido sustituida por otras con mayor nivel de resolución.

Técnicas moleculares para la determinación de HLA

Debido a que existen variantes de los alelos de HLA serológicamente indistinguibles y a otras limitaciones que presentan los métodos serológicos, así como la llegada de la tecnología del PCR (reacción en cadena de la polimerasa), la determinación de HLA se ha comenzado a realizar mediante métodos moleculares que se han ido modificando con el tiempo, como los que se detallan a continuación:

- **Método SSP (resolución intermedia):** se basa en sondas de oligonucleótidos con una secuencia específica, con un único alelo o grupo de alelos; las sondas coincidentes amplifican la secuencia a la que se unen. En condiciones de PCR estrictamente controladas, los pares de sondas perfectamente coincidentes dan lugar a la amplificación de las secuencias buscadas. Se evidencia mediante electroforesis en gel de agarosa y se visualiza por la exposición de bromuro de etidio y la exposición de luz ultravioleta. La interpretación de los resultados de SSP se basa en la presencia o ausencia de un fragmento específico de ADN amplificado.
- **Método SSOP (resolución intermedia):** utiliza iniciadores que se unen a las regiones constantes en los diferentes alelos de ese locus; entre los iniciadores se encuentran las regiones polimórficas que tienen las variaciones nucleotídicas que distinguen a un alelo de otro. El fundamento de esta técnica es la amplificación de una región de HLA por el método de PCR; posteriormente se utilizan sondas de oligonucleótidos específicas de secuencia (SSOP). Estas sondas son segmentos cortos de ADN de banda simple, de 18 a 24 nucleótidos, cada uno de los cuales está constituido por una secuencia de nucleótido complementaria a una secuencia particular, que se encuentra dentro de las regiones invariantes de los alelos HLA individuales. Estas sondas solo hibridan con sus secuencias exactamente complementarias en condiciones estrictas de hibridación.
- **Técnica basada en la tecnología luminex (alta resolución):** la tecnología luminex se fundamenta en los principios de citometría de flujo y puede medir de forma simultánea hasta 100 analitos. Las sondas de oligonucleótidos se encuentran unidas a microesferas, cada una de las cuales posee una cantidad específica de un fluorocromo, lo que da una emisión espectral característica. Cada microesfera puede ser unida con sondas de ADN o antígenos, lo que permite realizar la detección simultánea de diferentes patrones de hibridación,

en caso de emplear oligonucleótidos como sondas, o la presencia de anticuerpos contra diferentes antígenos cuando están acoplados antígenos a las microesferas.

- **Secuenciación (alta resolución):** la secuenciación es una técnica molecular que permite identificar cada una de las bases que componen una determinada muestra de ADN. El método más utilizado en la secuenciación de los ácidos nucleicos es el método de Sanger, el cual se conoce como el método de los terminadores de cadena o dideoxi. El análisis se realiza en un equipo por medio de electroforesis capilar.

FUENTE DE LAS CMH Y SELECCIÓN DEL DONADOR

En el trasplante alogénico de CMH existen dos aspectos fundamentales que definen la “barrera del trasplante”: el injerto del sistema inmunológico del donador en el receptor y el desarrollo de tolerancia. Esta barrera está definida en gran medida por los genes del HLA. Cuando la compatibilidad entre el donador y el receptor no es suficiente, es altamente probable que se genere una respuesta inmunológica aloreactiva brusca y grave, de manera que el grado de compatibilidad y el uso de agentes inmunosupresores son fundamentales para el éxito del trasplante.

El donador ideal para un trasplante alogénico de CMH es un familiar HLA idéntico, generalmente un hermano. Sin embargo, esto solo se logra en el 30-35% de los casos. Cuando no existe un donador HLA idéntico, otros posibles donadores pueden ser un familiar haplo idéntico (comparten un haplotipo y difieren de manera variable en el haplotipo que no comparten) o un donador compatible, no relacionado.

A medida que aumenta el grado de incompatibilidad en los loci HLA, el porcentaje de individuos con pérdida de trasplante aumenta y llega al máximo (39%) en aquellas personas que muestran pruebas cruzadas de anticuerpos antilinfocitos positivos frente a las células del donante. De igual manera, se incrementa el riesgo de enfermedad vsH.

Para definir el grado de compatibilidad se deben determinar los alelos correspondientes a HLA- A, HLA-B y HLA C para clase I y para clase II DRB1 en técnicas de alta resolución. Cuando se trata de un donador no relacionado, con excepción de las células de la sangre de cordón umbilical, adicionalmente se debe determinar DQB1.

Fuente de las células madre hematopoyéticas

Existen tres fuentes de CMH: sangre periférica, sangre de cordón umbilical y médula ósea. Cada una de ellas

posee características particulares que las pueden hacer más convenientes en ciertas situaciones. En el Cuadro N° 2 se resumen las características de estas.

Cuadro N° 2. Características de las células madre hematopoyéticas según su origen			
Fuente	Contenido de células madre CD 34+ (media)	Contenido de linfocitos T (CD3+)	Inmunogenicidad
Sangre periférica	8×10^6 /kg	250×10^6 /kg	Alto
Médula ósea	$2-3 \times 10^6$ /kg	25×10^6 /kg	Intermedio
Sangre de cordón umbilical	0.2×10^6 /kg	2.5×10^6 /kg	Bajo

Resulta, entonces, que las células provenientes de la sangre periférica son las que proveen el mayor contenido de linfocitos T y de CMH, de manera que son las que permiten mayor prontitud en la recuperación de los conteos celulares después del trasplante. Por tener un alto contenido de linfocitos T, proveen un mayor efecto de injerto vs tumor, pero al mismo tiempo, el riesgo de enfermedad lvSH es mayor. De tal forma, se considera una fuente adecuada de células madre para pacientes con enfermedad maligna.

Las CMH provenientes de la médula ósea, en cambio, resultan una mejor fuente de células madre para aquellos pacientes que requieren un trasplante por una enfermedad no maligna.

Por su parte, las CMH provenientes de la sangre del cordón umbilical, son las que generan menor riesgo de enfermedad lvSH y permiten un grado mayor de incompatibilidad. Cuando se cuenta con un banco de sangre de cordón umbilical, son células que ya están recolectadas, lo que hace más rápida la búsqueda de

un donador cuando no existe un familiar compatible.

COMPLICACIONES**Enfermedad injerto contra huésped**

Es la principal complicación de los pacientes con trasplante alogénico de CMH. Constituye una reacción aloinmune que se presenta con mayor frecuencia conforme aumenta el grado de disparidad del HLA del donador y el receptor. También son factores de riesgo la edad del paciente, la intensidad del régimen de acondicionamiento, el tratamiento profiláctico empleado, el género femenino como donador y el uso de células madre recolectadas de la sangre periférica. Puede presentarse aun cuando se utiliza profilaxis y cuando el donador es HLA idéntico.

Esta enfermedad es causada por linfocitos T, los cuales reaccionan contra células presentadoras de antígenos del huésped y causan daño a los órganos blanco (Figura N° 3).

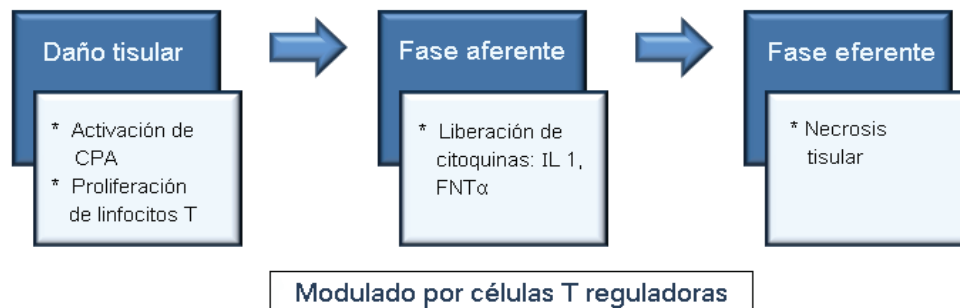


Figura N° 3. Mecanismo de la enfermedad injerto vs huésped.

La enfermedad injerto contra huésped puede ser aguda o crónica. La aguda se desarrolla en los primeros 100 días y los órganos blanco principales son la piel, el tracto gastrointestinal y el hígado. En piel se manifiesta como un brote pruriginoso y doloroso. El brote puede progresar y producir pápulas, bulas y descamación. El compromiso hepático produce una hepatopatía colestásica, que se puede acompañar o no de ictericia. En el tracto gastrointestinal se presentan anorexia, náuseas, vómitos y diarrea acuosa, que puede ser abundante y producir sangrado.

La forma crónica es aquella que aparece después de los 100 días. También puede seguir a una forma aguda. Es el principal determinante del pronóstico a largo plazo. Tiene características de enfermedad autoinmune y al mismo tiempo produce inmunodeficiencia. Frecuentemente afecta la piel, produciendo despigmentación, pápulas liqueinoides, fibrosis dérmica y subcutánea y alopecia. Compromete la cavidad oral con manifestaciones de liquen plano, úlceras, atrofia y sequedad. Puede afectar también los ojos (sequedad), el intestino, el hígado, los pulmones y las articulaciones.

COMPLICACIONES TEMPRANAS

Toxicidad del régimen de acondicionamiento

La quimioterapia y la radioterapia con frecuencia producen náuseas, vómitos, alopecia, mucositis, o diarrea. Todos estos factores pueden dificultar la alimentación, por lo que puede ser necesaria la alimentación parenteral.

Otras complicaciones menos frecuentes, pero que ameritan tratamiento preventivo, son la cistitis hemorrágica y la enfermedad venooclusiva del hígado. Esta última se caracteriza por ictericia, retención de líquidos y aumento de peso con hepatomegalia dolorosa.

Cuando se utilizan esquemas de acondicionamiento de dosis reducida es posible disminuir la toxicidad del acondicionamiento.

Complicaciones infecciosas

Las infecciones se presentan en el trasplante de CMH por el daño de piel, mucosas e hígado. A esto se suman factores como el uso de catéteres venosos centrales o sondas vesicales, la inmunosupresión y la neutropenia.

Durante el período de la aplasia suelen presentarse las siguientes condiciones:

- γ Infecciones bacterianas, incluyendo Gram positivos y Gram negativos.
- γ Virus, especialmente herpes I y II, herpes zoster y citomegalovirus. Otros menos frecuentes se presentan en pacientes sometidos a trasplante alogénico de CMH y se relacionan con el grado de inmunosupresión; estos incluyen: Epstein-Barr virus, herpes virus 6, adenovirus o el BK virus.
- γ Las infecciones por hongos, en especial *Candida*, que son frecuentes durante la fase de aplasia y por ello se amerita el tratamiento profiláctico. Otros hongos como *Aspergillus* o *Mucor* son poco frecuentes en el contexto del trasplante autólogo, pero se presentan con mayor frecuencia en el alogénico.
- γ Infecciones por *Pneumocystis* y *Mycoplasma*, que son de bajo riesgo en el trasplante autólogo.

Después de la recuperación de la aplasia, el riesgo de infecciones está estrechamente relacionado con el grado de recuperación inmunológica, de manera que el riesgo disminuye de forma rápida en pacientes sometidos a un trasplante autólogo, pero se mantiene en quienes reciben un trasplante alogénico y requieren tratamiento inmunosupresor. En este momento el principal problema infeccioso es citomegalovirus y otros virus, así como los hongos.

Otras complicaciones

Un tercer grupo incluye la recaída de la enfermedad de fondo, especialmente cuando se trata de enfermedades malignas. En general, resulta más frecuente después del trasplante autólogo, debido a que no existe el efecto injerto vs tumor.

COMPLICACIONES TARDÍAS

En etapas tardías después del trasplante, se pueden presentar complicaciones de distintos tipos, incluyendo básicamente infecciones, cataratas, hipotiroidismo, infertilidad, infecciones y trastornos psicológicos.

Las infecciones después de los primeros meses del trasplante dependen de la presencia de enfermedad lvsH y de la reconstitución inmunológica.

RESUMEN

- γ El trasplante autólogo es aquel en el que se recolectan y preservan las CMH de un paciente para luego someterlo a quimio y/o radioterapia de altas dosis y lograr una rápida recuperación mediante la infusión de las células del mismo paciente.

- γ El trasplante alogénico de CMH es aquel en el que el donador es un individuo sano. Este procedimiento puede utilizarse para restituir una o más líneas celulares deficientes.
- γ Cuando se emplea el trasplante alogénico de CMH para el tratamiento de enfermedades malignas, el efecto injerto vs tumor contribuye al tratamiento de la enfermedad maligna y permite, en algunas situaciones, no utilizar dosis altas de quimio y/o radioterapia.
- γ La compatibilidad entre donante y receptor está fuertemente relacionada con la posibilidad de rechazo del trasplante de CMH, así como con el riesgo de enfermedad lvsH.
- γ El sistema HLA es uno de los principales factores que definen la compatibilidad. Al determinar la compatibilidad se recomienda evaluar A, B y C para la clase I y DRB1 para la clase II. Cuando se evalúa la compatibilidad entre no familiares, es recomendable incluir también DQB1.
- γ Las técnicas moleculares de alta resolución permiten determinar diferencias que pueden resultar significativas, por lo que han resultado fundamentales para mejorar los resultados del trasplante alogénico de CMH, especialmente cuando se trata de donadores no relacionados.
- γ Las CMH pueden obtenerse de la sangre periférica, de la médula ósea o del cordón umbilical.
- γ La velocidad de la recuperación de la aplasia se relaciona con el contenido de células CD34+ y el riesgo de enfermedad lvsH, con el contenido de linfocitos T infundidos durante el trasplante.
- γ La enfermedad lvsH es una complicación del trasplante alogénico de CMH. Es una reacción aloinmune causada por los linfocitos T del donador, cuando reaccionan ante las células presentadoras de antígeno del paciente receptor.
- γ Otras complicaciones del trasplante de CMH pueden dividirse en aquellas relacionadas al régimen de acondicionamiento, a complicaciones infecciosas y a recaída de la enfermedad de fondo.

BIBLIOGRAFÍA

Apperley J, Carreras E, Gluckman E, Masszi T. EBMT-ESH Handbook on haematopoietic stem cell transplantation. 6 ed. París: European School of Hematology; 2012.

Arrazola M. Tipificación de los alelos HLA clases I y II. Revista Médica del IMSS 2005; 43(Supl. 1): S95-S97.

Atsuta Y, Morishima Y, Suzuki R, Nagamura-Inoue T, Taniguchi S, Takahashi S, *et al.* Comparison of unrelated cord blood transplantation and HLA-mismatched unrelated bone marrow transplantation for adults with leukemia. Biol Blood Marrow Transplant 2012; 18(5): 780-787.

Copelan EA. Hematopoietic stem-cell transplantation. N Engl J Med 2006; 354(17): 1813-1826.

Eapen M, Klein JP, Ruggeri A, Spellman S, Lee SJ, Anasetti C, *et al.* Impact of allele-level HLA matching on outcomes after myeloablative single unit umbilical cord blood transplantation for hematologic malignancy. Blood 2014; 123(1): 133-140.

Ljungman P, Bregni M, Brune M, Cornelissen J, de Witte T, Dini G, *et al.* Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumors and immune disorders: current practice in Europe 2009. Bone Marrow Transplant 2010; 45(2): 219-234.

Miano M, Labopin M, Hartmann O, Angelucci E, Cornish J, Gluckman E, *et al.* Haematopoietic stem cell transplantation trends in children over the last three decades: a survey by the pediatric diseases working party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. Bone Marrow Transplant 2007; 39(2): 89-99.

Porras O. Ingeniería de la célula madre. Acta Méd Costarric 2005; 47(2): 69-75.

Speiser DE, Tiercy JM, Rufer N, Grudschöber C, Gratwohl A, Chapuis B, *et al.* High resolution HLA matching associated with decreased mortality after unrelated bone marrow transplantation. Blood 1996; 87(10): 4455-4462.

Wingard JR, Gastineau DA, Leather HL, Snyder E, Szczepiorkowski ZM, *et al.* Hematopoietic stem cell transplantation. A handbook for clinicians. Maryland: AABB Bethesda; 2009.

*Dra. Xinia Rojas Camacho
Dr. Miguel A. Rodríguez Pineda
Dra. Ana L. Caballero Serrano*

INTRODUCCIÓN

A pesar de los enormes beneficios que aporta la terapéutica transfusional con sangre o sus hemocomponentes, se debe dejar claro que cada uno de estos tiene indicaciones médicas precisas, basadas en la evidencia científica, con el objetivo de no exponer a las personas a los riesgos propios de un tratamiento médico, como la transfusión.

El banco de sangre es el servicio hospitalario encargado de proveer los hemocomponentes, asegurando la calidad y la seguridad de estos, en los momentos que se requiera. Para ello, debe participar de manera activa junto con los servicios de medicina y cirugía, y en los comités de medicina transfusional del centro médico, con el objetivo de establecer criterios y protocolos que permitan abastecer las necesidades del hospital en cada uno de los procedimientos que realicen.

El concepto del banco de sangre varía de un lugar de depósito de donaciones a un sitio que recibe las donaciones, prepara los hemocomponentes, asegura la calidad de la transfusión y ayuda a disminuir los riesgos de esta herramienta terapéutica.

SELECCIÓN DE DONADORES DE SANGRE

Los bancos de sangre centrales y los servicios de medicina transfusional dependen de los donantes voluntarios o familiares para el suministro de la sangre que se requiere para cumplir con las necesidades de los pacientes. Es indispensable que las condiciones del local y el trato que brinda el personal de estos bancos sea agradable, cómodo, limpio y ordenado, de forma tal que los donadores se sientan atraídos, seguros y tan confortables como sea posible.

El área de donación debe ser atractiva, bien iluminada y debe estar abierta en horarios convenientes para los donadores. Cada banco de sangre debe tener establecidos sus procedimientos y los servicios de transfusión en un manual, para que pueda ser acreditado de acuerdo con las normas de organismos internacionales o entes nacionales de acreditación. El cumplimiento de estas normas debe ser supervisado por el director del banco de sangre. Además, este

manual debe ser revisado por un experto por lo menos una vez al año y el director debe aprobar las modificaciones de los procedimientos en relación con la seguridad de los pacientes y donantes.

El manual debe incluir:

1. Criterios de selección de donadores.
2. Métodos de las pruebas utilizadas.
3. Procedimientos de flebotomía.
4. Procedimientos de fraccionamiento, etiquetado y almacenamiento.
5. Metodología de control de calidad.
6. Manejo de la reacción adversa.
7. Manejo de pruebas serológicas positivas.
8. Manejo de los inventarios de los hemocomponentes, de acuerdo a grupo sanguíneo.
9. Garantía de calidad.

INTERROGATORIO CLÍNICO

En el momento en que el donador se inscribe en el banco de sangre debe de suministrar su cédula de identidad y datos personales, especialmente su dirección o teléfono donde pueda ser localizado.

Se debe obtener y registrar información actualizada por cada donación. Los registros de donación deben conservarse por espacio de 10 años y deben posibilitar la notificación al donante de cualquier información que se requiera. Comprenden los siguientes datos:

1. Fecha y hora de la donación.
2. Nombre y apellidos.
3. Dirección.
4. Sexo.
5. Fecha de nacimiento. Los donadores de sangre deben ser mayores de edad, excepto cuando la donación es de células madre para un trasplante alogénico.
6. Características singulares del donante. Determinada información acerca del donante puede permitir al banco de sangre un uso óptimo de la donación. Los donadores consanguíneos del receptor destinatario deben registrarse para que esos componentes celulares sean irradiados.

EXÁMENES PREVIOS A LA DONACIÓN

Historia clínica

Durante la confección de la historia clínica es necesario formular algunas preguntas muy específicas para asegurar que, en la medida de lo posible, la donación resulte segura para el donante y para el receptor. Personal adecuadamente entrenado debe interrogar a los donantes acerca de conductas de riesgo e indicar si se han obtenido respuestas satisfactorias; por lo tanto, la entrevista debe ser realizada con suficiente tiempo y en un ambiente de cordialidad y confianza, logrando así que el donador brinde la información lo más completa y certera posible. El entrevistador debe evaluar todas las respuestas para determinar si se acepta o no la donación.

El sistema nacional de sangre de un país debe asegurar que se formulen todos los interrogantes necesarios y que los donantes reciban un mensaje consistente, por lo que se recomienda el uso de un cuestionario clínico y criterios de selección uniformes en todo el país. Los donantes que han sido rechazados, tanto temporal como definitivamente, deben recibir una explicación completa sobre las razones que mediaron para tomar esa decisión. Los donantes rechazados temporalmente deben ser informados acerca de cuándo pueden volver a donar. Todas estas acciones deben ser registradas y estar a disposición del sistema de sangre nacional, guardando los criterios de confidencialidad.

Examen físico

En cada donante se deben evaluar las siguientes variantes:

1. Aspecto general: debe corresponder a una persona saludable.
2. Peso: la persona debe pesar más de 50 kg.
3. Temperatura: la temperatura oral del donante no debe superar los 37,5 °C.
4. Pulso: la frecuencia del pulso se debe contar por lo menos durante 15 segundos. No debe presentar irregularidades patológicas y debe hallarse entre 50 y 100 latidos por minuto.
5. Presión arterial: la presión arterial no debe ser mayor a 180 mmHg sistólica y 100 mmHg diastólica. Los donantes cuya presión arterial es superior a estos valores deben ser referidos al servicio de emergencias del hospital.
6. Lesiones de la piel: la piel del sitio de venipuntura debe estar libre de lesiones. Ambos brazos deben ser examinados en búsqueda de signos de uso de drogas por vía parenteral. La piel no debe presentar lesiones de tipo infecciosas, ni nódulos hemorrágicos o rojo púrpura o placas induradas sugestivas

de sarcoma de Kaposi.

Todos los donantes deben recibir materiales educativos sobre los signos y síntomas clínicos relacionados con la infección por Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH)/sida, así como las actividades de alto riesgo para la transmisión del virus y la importancia de abstenerse de donar sangre si han participado en estas actividades o han experimentado esos signos o síntomas.

Es útil suministrar datos acerca de las pruebas serológicas que se le realizarán a la sangre del donante. El mismo material educativo puede ser utilizado para advertir al donante sobre posibles reacciones y suministrarle indicaciones para los cuidados posteriores a la flebotomía.

Por otra parte, la información que brinde la persona que desea donar debe ir debidamente firmada por esta, con la indicación de que aporta información fidedigna. Todo este proceso se considera el consentimiento informado del donador.

Exámenes de laboratorio: hemoglobina o hematocrito

El nivel de hemoglobina requerido es de 12,5 g/L. Las cifras altas de hemoglobina asociadas a padecimientos hematológicos o secundarios o a enfermedad pulmonar o cardíaca, no pueden ser considerados donadores de sangre, aunque se les practique la flebotomía. Este procedimiento se considera sangría terapéutica y la sangre no puede ser transfundida. El hematocrito por ser una medición relativa, no se utiliza como parámetro para excluir donantes.

Autoexclusión confidencial de unidades

Todo donante debe tener la oportunidad de manifestar, de una manera más confidencial, su voluntad para que su sangre no sea utilizada para transfundir a un paciente. Esto se realiza por medio de una boleta, donde solo se anota el número de la donación; esta debe ser llenada por el donador después de haber realizado la flebotomía. Dicha boleta debe depositarse en un buzón y el personal del banco de sangre debe revisarla antes de validar la unidad.

CATEGORÍAS ESPECIALES DE DONANTES

Pueden hacerse excepciones a los requerimientos habituales de selección para categorías especiales de donantes:

1. **Donantes autólogos.** Las indicaciones para la extracción son las siguientes:

- a) *Extracción prequirúrgica*, en la cual se extrae la sangre y se almacena antes de la cirugía. Las extracciones se inician como mínimo, con tres semanas de anticipación.
- b) *Hemodilución normovolémica*, en la cual la sangre se extrae al comenzar la cirugía, luego se infunde durante o al final de dicho procedimiento.
- c) *Recolección intraoperatoria de sangre*, en la que se recupera la sangre vertida en el campo operatorio o de los dispositivos de drenaje, se procesa y se devuelve al paciente.

2. Donaciones para receptores específicos o donaciones dirigidas: este tipo de donación se puede requerir cuando un paciente con anticuerpos, se le dificulta encontrar sangre compatible; en estos casos, si el donante es familiar obliga a que el componente sea sometido a irradiación para prevenir la reacción injerto versus huésped.

TAMIZAJE DE LAS UNIDADES

Toda unidad de sangre debe ser tamizada previamente por los siguientes marcadores serológicos:

1. Anticuerpos antiviral de inmunodeficiencia humana (VIH1-2).
2. Anticuerpos antiviral de hepatitis C (VHC).
3. Antígeno de superficie de hepatitis B (HBsAg).
4. Anticuerpos anti core hepatitis B.
5. Anticuerpos anti *Trypanosoma cruzi*.
6. Anticuerpos antiviral linfotrófico T humano (HTLV1-2).
7. Anticuerpos anti *Treponema pallidum*.
8. Anticuerpos anti eritrocitos humanos.

Las pruebas utilizadas tienen que ser de alta sensibilidad y especificidad. Se debe guardar registro impreso de los resultados y todas deben utilizar punto de corte para definir el criterio de positividad. El sistema nacional de sangre debe tener estrecha relación con el sistema de vigilancia epidemiológica nacional, con el objetivo de definir si se requiere aumentar las pruebas de tamizaje. Solo queda eximida de estos requisitos la detección de anticuerpos anti eritrocitos humanos.

COMPONENTES DE LA SANGRE

De una unidad de sangre total, fraccionada en un máximo de ocho horas posterior a la donación, y bajo condiciones óptimas, se obtienen los siguientes componentes:

- *Glóbulos rojos empacados.*
- *Plasma:*

- a) Plasma humano normal (PHN).
- b) Plasma fresco congelado (PFC).
- c) Críoprecipitados.

- *Concentrados de plaquetas.*

Etiquetado de los componentes

Se requiere la siguiente información en caracteres claros y legibles, en una etiqueta firmemente adherida al contenedor de todas las unidades de sangre y hemocomponentes:

1. El nombre pertinente del hemocomponente.
2. Una identificación alfanumérica, que relaciona la procedencia de la unidad con un número único.
3. El tipo y cantidad de anticoagulante.
4. Fecha de vencimiento, incluidos día, mes, año.
5. Temperatura de almacenamiento recomendada.
6. Tipo ABO y Rh.
7. La correspondiente clasificación del donante: "donante autólogo", "donante reposición" o "donante voluntario".
8. Todo aditivo, agente de sedimentación o agente crioprotector que pueda estar aún presente en el componente.
9. Para pools de componentes, el nombre y volumen del componente. El número de unidades en la mezcla y su tipo ABO y Rh deben figurar en la etiqueta o asignar un número específico para el pool; en estos casos los números de identificación de las unidades individuales en la mezcla deben de estar escritos en la boleta de entrega y en los registros del servicio.

VENTAJAS DE FRACCIONAR LA UNIDAD DE SANGRE

Las principales ventajas de fraccionar la unidad de sangre son:

- a) Una terapia dirigida a la deficiencia del paciente.
- b) Mayor aprovechamiento de la unidad.
- c) Almacenar y preservar de manera correcta cada factor de la coagulación.

GLÓBULOS ROJOS EMPACADOS

Los glóbulos rojos empacados suministran mayor cantidad de eritrocitos, volumen por volumen, que la sangre total. Se obtienen por centrifugación o sedimentación; se retira la mayor parte del plasma, quedando con un hematocrito aproximado de 75 ml/dl.

Pueden almacenarse, dependiendo del anticoagulante en refrigeración, 21 días si es con ácido cítrico dextrosa (ACD) o con citrato fosfato dextrosa (CPD), o

35 días si el anticoagulante es citrato fosfato dextrosa adenina (CPDA-1).

Están indicados cuando es importante aumentar la capacidad de transporte de oxígeno en el paciente; es decir, cuando la anemia es suficientemente severa para causar síntomas. Las pérdidas agudas deben tratarse en un inicio con solución fisiológica; en caso de no controlarse se debe considerar la transfusión de GRE, por lo que los “antiguos” criterios de reponer la volemia con sangre total han quedado en desuso.

La utilización de glóbulos rojos proporciona un eficiente mecanismo para remontar rápidamente el hematócrito del paciente. Los GRE pueden *lavarse*, en caso de pacientes con reacciones alérgicas al plasma; *leu-correducirse*, en caso de candidatos a trasplante de médula ósea, para evitar que se forme anticuerpos anti HLA, o que reciban un citomegalovirus transfusional; *irradiarse*, en caso de trasplantes de médula ósea y neonatos prematuros; y *congelarse*, en caso de receptores sensibilizados y de fenotipos poco comunes.

Indicaciones

La Agencia Francesa de Seguridad Sanitaria de Productos de la Salud recomienda, con base en consenso de expertos:

- 7 g en individuos sanos.
- 8-9 g/L en pacientes con enfermedad cardiovascular documentada.
- 10 g/L con síndrome coronario agudo o insuficiencia cardíaca que no toleran niveles más bajos.

PLASMA FRESCO

El plasma fresco es la porción líquida de la sangre que se obtiene por centrifugación, sedimentación de la sangre total o mediante plasmaféresis. Si el plasma es separado antes de ocho horas de extraída la sangre, conserva su actividad procoagulante hasta por un año, incluso con valores de 70-80% de efectividad, cuando se mantiene a temperaturas de -30 °C o inferiores; esto se denomina plasma fresco congelado (PFC). Una vez descongelado, debe administrarse al paciente dentro de las seis horas siguientes, para obtener los mayores efectos; no obstante, puede almacenarse durante un máximo de 24 horas entre 1-6 °C.

Sus indicaciones se restringen a los siguientes casos específicos:

1. Sangrado o procedimiento invasivo en un paciente con una deficiencia de múltiples factores de coagulación con el tiempo de protrombina (TP) y/o tiempo parcial de tromboplastina (TPT) marcada-

mente prolongados, como en el caso de enfermedad hepática. Nivel de evidencia II.

2. Corregir deficiencias de factores de coagulación para los cuales no haya disponibilidad del factor específico. Nivel de evidencia III.
3. Corregir hemorragia microvascular cuando el TP y el TPT estén 1,5 veces por encima del valor normal, como ocurre en la coagulación intravascular diseminada (CID), siempre y cuando la enfermedad de base sea también tratada adecuadamente. Nivel de evidencia II.
4. Corregir la hemorragia microvascular secundaria a deficiencia de factores de coagulación en pacientes transfundidos con más de un volumen sanguíneo (transfusión masiva), cuando no es posible determinar el TP o el TPT de una manera continua. Nivel de evidencia II.
5. Para reemplazo con plasmaféresis en pacientes con púrpura trombocitopénica trombótica. Nivel de evidencia I.

El plasma fresco congelado no debe utilizarse como:

1. Expansor de volumen.
2. Suplemento nutricional.
3. Reemplazo de inmunoglobulinas.
4. Profilácticamente en transfusión masiva.
5. Profilácticamente después de cirugía extracorpórea.

Indicaciones para el uso del plasma simple (plasma humano normal)

Las indicaciones para el uso de plasma simple o plasma humano normal se limitan solo a pacientes con deficiencias de factores termoestables únicos o múltiples (hepatópatas).

En caso de sangrado que comprometa la vida o en cirugía de emergencia, se debe revertir el efecto de la warfarina. El empleo de vitamina K no está indicado, ya que no actúa inmediatamente y solo se pueden utilizar presentaciones de uso intravenoso. La dosis para revertir el efecto de dicho medicamento es de 8 ml/kg peso. Nivel de evidencia III.

La dosificación del plasma fresco y del simple es de 10-15 ml/kg de peso.

CRIOPRECIPITADOS

Se preparan a partir de PFC, dejándolo descongelar lentamente -de 12 a 18 horas- a una temperatura de 1-6 °C. Se obtiene un precipitado blanquecino. Se centrifuga la bolsa a 4 °C y se separa el exceso de plasma, dejando un volumen remanente de 5 a 10 ml. El

producto se congela a -30°C y mantiene su actividad hasta por un año. Para su uso, se descongela a 37°C , manteniéndose luego a temperatura ambiente y administrando en las cuatro horas siguientes; no se debe re congelar.

Cada bolsa de crioprecipitado proporciona entre 50 y 100 unidades de factor VIII; alrededor de 250 mg de fibrinógeno; un 30% de factor XIII y entre 40-70% de factor de Von Willebrand.

El crioprecipitado está indicado en:

1. Sangrado o procedimiento invasivo en hemofilia A o enfermedad de Von Willebrand.
2. Sangrado o procedimiento invasivo en hipofibrinogenemia o disfibrinogenemia.
3. Terapia de reemplazo en coagulación intravascular diseminada.
4. Terapia de reemplazo en deficiencia del factor XIII.
5. En recambios plasmáticos, cuando los niveles de fibrinógeno están por debajo de 100 mg/dl.

Dosis: una unidad por cada 10 kg de peso.

CONCENTRADOS PLAQUETARIOS

Los concentrados plaquetarios son preparados a partir de sangre total, por fraccionamiento en las ocho horas posteriores a la extracción, mediante el proceso de centrifugación: la primera a baja velocidad para obtener un plasma rico en plaquetas (PRP) y la segunda a alta velocidad, donde se separa el plasma a congelar, dejándose un volumen residual de 40 a 50 ml, que es el que contiene las plaquetas. Las plaquetas así obtenidas deben permanecer entre 20° y 24°C por espacio de cinco días; durante este período se debe mantener en agitación constante, idealmente horizontal, para evitar el daño mecánico de estas. Cada concentrado contiene un aproximado de $5,5 \times 10^{10}$ plaquetas. Cuando se utiliza este tipo de concentrados se requieren seis unidades por cada transfusión (pool). Además, se pueden obtener concentrados de aféresis, donde el recuento mínimo es de $3,0 \times 10^{11}$ plaquetas, dosis necesaria para transfundir un paciente; la utilización de plaquetas de aféresis tiene un menor riesgo inmunológico e infeccioso, dado a que todas las plaquetas provienen de una sola persona.

Indicaciones

La decisión de transfundir plaquetas depende fundamentalmente de la condición clínica del paciente (si hay o no sangrado activo por trombocitopenia) y de la actividad funcional de las plaquetas. Entre las indicaciones más claras se pueden citar:

1. Hemorragia activa con un conteo de plaquetas inferior a $50 \times 10^9/\text{L}$ (menos de $50.000/\mu\text{L}$) en pacientes con trombocitopenias centrales por aplasia medular, leucemias, síndromes mielodisplásicos o quimioterapias intensivas o por presencia de plaquetas funcionalmente anormales (empleo de aspirina).
2. Transfusión profiláctica en pacientes con conteos menores a $10 \times 10^9/\text{L}$ (menos de $10.000/\mu\text{L}$) cuando tienen asociados otros "factores clínicos" tales como fiebre, infección, coagulación intravascular diseminada o marcada esplenomegalia.
3. Pacientes que van a ser sometidos a cirugía mayor y que tienen conteos menores a $50 \times 10^9/\mu\text{L}$ (menos de $50.000/\mu\text{L}$). Para cirugía cardiovascular, del sistema nervioso central o cirugía oftalmológica (retina) se recomiendan cifras de plaquetas mayores a $100.000/\mu\text{L}$ (grado C, nivel IV).
4. Para procedimientos invasivos como punción lumbar, anestesia epidural, gastroscopía con biopsia, inserción de catéteres centrales, biopsia transbronquial, biopsia hepática, laparotomía o procedimientos similares, el conteo de plaquetas debe ser de al menos 50.000 (grado B, nivel III).
5. Sangrado asociado con un defecto cualitativo plaquetario independiente del conteo de plaquetas.

Contraindicaciones

La transfusión profiláctica de plaquetas no es efectiva y está generalmente contraindicada cuando la trombocitopenia es debida a destrucción plaquetaria, como en la púrpura trombocitopénica inmunológica, la púrpura trombocitopénica trombótica, el síndrome urémico hemolítico, hiperesplenismo, la trombocitopenia inducida por heparina y el dengue.

La vida media de las plaquetas transfundidas depende además de la compatibilidad ABO, de las condiciones de almacenamiento y del estado clínico del paciente. Es menor cuando existe fiebre, infección o hemorragia actual, por lo que ante las situaciones descritas se puede tener una respuesta disminuida a dicha transfusión.

Dosis: cada paciente debe recibir más de $2,5 \times 10^{11}$ plaquetas, lo cual corresponde a seis concentrados de plaquetas o una unidad de aféresis.

Durante todo momento, las plaquetas deben tratarse con delicadeza con el objetivo de no activarlas.

CONCENTRADOS LEUCOCITARIOS

Los concentrados leucocitarios se indican en pacientes neutropénicos con cuadros sépticos. El método para obtenerlo es colocando en una máquina de aféresis a un donador sano, el cual se estimula previamente con dexametasona para aumentar el número de leucocitos circulantes. La transfusión plantea riesgo para el receptor; sin embargo, se considera como una medida heroica cuando el paciente no tiene alternativas terapéuticas.

PROCEDIMIENTOS ESPECIALES A LOS HEMOCOMPONENTES

a) Leucorreducción

Existen varios tipos y marcas de filtros leucorreductores, los cuales se encuentran disponibles en el mercado. Las diferencias se basan en el nivel de leucorreducción deseado, la indicación clínica y el tipo de paciente.

Los filtros de *microagregados* son generalmente mayas de plástico o poliéster, o con pasos de 20 a 40 micrones. Estos filtros usualmente logran una leucorreducción más alta que 2 logs, por lo que los nuevos filtros de *absorción selectiva* son más apropiados. Estos filtros están hechos de fibras de poliéster o acetato de celulosa, y producen una leucorreducción de 2-4 logs (más del 99,9%). En ambos casos, la pérdida globular es mínima.

Indicaciones clínicas

Los componentes celulares leucorreducidos están recomendados para la prevención de:

- Aloinmunización a antígenos HLA.
- Reacciones transfusionales febriles.
- Transmisión de citomegalovirus.

Desventajas

- Aumenta el costo de la transfusión.
- Incrementa el tiempo de preparación y requiere de más personal por parte del banco de sangre.
- Obstrucción por presencia de grumos.

b) Irradiación

La enfermedad de injerto vs huésped (EICH) es una complicación común en los pacientes que reciben trasplante de células madre hematopoyéticas. EICH ha sido también diagnosticada luego de la transfusión de componentes celulares en pacientes inmunosuprimidos o en pacientes inmunocompetentes, donde com-

parten haplotipos HLA con el donador, circunstancia que es más común cuando familiares consanguíneos son los donantes. La prevención se hace utilizando hemocomponentes irradiados a una dosis de irradiación gamma entre 1500 a 3500 cGy.

Indicaciones absolutas

1. Pacientes trasplantados de médula ósea.
2. Pacientes con síndromes de inmunodeficiencia congénita.
3. Transfusiones intrauterinas.
4. Pacientes con linfoma de Hodgkin.
5. Receptores de donaciones procedentes de un familiar consanguíneo de primer o segundo grado.
6. Transfusión de plaquetas compatibles.
7. Neonatos prematuros de 1200 g.

Indicaciones relativas

1. Hemopatías malignas diferentes al linfoma de Hodgkin.
2. Pacientes con tumores sólidos en tratamiento con quimioterapia y radioterapia.
3. Infección por VIH.

LAS PRUEBAS PRETRANSFUSIONALES

Las pruebas pretransfusionales mínimas que deben realizarse en un banco de sangre son:

- Grupos sanguíneos ABO y RHO (D) del donador y del paciente.
- Pruebas inmunohematológicas. Constan de dos fases: rastreo de anticuerpos antieritrocitos y prueba cruzada mayor.

Rastreo de anticuerpos antieritrocitos

Previene la reacción hemolítica extravascular. Con esta determinación el personal del banco de sangre asegura que el receptor no tiene anticuerpos irregulares antieritrocitos, que puedan generar una hemólisis extravascular.

Prueba cruzada mayor

Donde se asegura que no hay diferencias de grupo ABO y evita la reacción hemolítica intravascular y extravascular.

El objetivo que se persigue es garantizar que los glóbulos rojos a transfundir son ABO compatibles con el receptor y confirmar que en el plasma del paciente no existen anticuerpos contra los antígenos de los eritrocitos del donador. Existen limitaciones técnicas como:

1. El hecho de que no previene la inmunización del receptor.
2. En ocasiones no detectan errores en la clasificación de grupo ABO y Rho; estos casos se circunscriben a muestras erróneas.
3. No previene reacciones febriles o alérgicas ocasionadas por anticuerpos antiplaquetarios, antileucocitarios o contra proteínas del suero; de ahí la importancia de que el servicio de enfermería reporte las reacciones post transfusionales y que cada banco de sangre esté en capacidad de investigar anticuerpos, cuando el caso lo requiera.

Se han reportado casos donde no hay correspondencia entre la prueba cruzada en mención y la compatibilidad *in vivo* en el donador-receptor; es decir; se han visto pruebas compatibles *in vitro* que representan destrucción de los eritrocitos en la circulación del receptor. Lo anterior corresponde, por lo general, a niveles bajos de anticuerpos, como lo que usualmente puede ocurrir con los anticuerpos del sistema sanguíneo Kidd.

Cuando se detectan anticuerpos en el suero del paciente, se puede recurrir al uso de paneles de células de fenotipos conocidos, en combinación con diferentes técnicas enzimáticas, para lograr la identificación precisa del anticuerpo hallado y su título, y así, encontrar sangre compatible para el paciente.

TRANSFUSIÓN EN POLITRAUMATIZADOS Y SANGRADO MASIVOS

En caso de emergencia se procede de la siguiente forma:

- a. *Si no hay muestra del receptor:* enviar dos unida-

des O Rho (D) negativo de glóbulos rojos empacados. Si no se dispone de GRE O Rho (D) negativo y con el objetivo de salvar la vida de un paciente, enviar dos unidades de GRE O positivo. Tiempo aproximado: un minuto. Debe ser requisito la obtención de una muestra antes de transfundir las dos primeras unidades, con el fin de realizar todas las pruebas estipuladas. En estos casos el banco de sangre debe tener unidades dispuestas con el grupo sanguíneo corroborado.

- b. *Si hay muestra del receptor:* determinar el grupo sanguíneo ABO-Rho (D) del paciente, seleccionar dos bolsas de GRE ABO-Rho (D) compatibles, previa verificación de grupo. Tiempo aproximado: cinco minutos. Si se dispone de más tiempo, realizar la prueba rápida de compatibilidad entre el suero del receptor y suspensión de eritrocitos del donador. Tiempo aproximado: 10 minutos.
- c. El envío de las unidades debe ser pronto para colaborar con la resucitación del paciente.
- d. Posteriormente, se continúa con el rastreo de anticuerpos y la prueba cruzada completa; una vez finalizada, se procede a notificar el resultado de las pruebas inmunohematológicas.

En aquellos casos en que el paciente sea Rho (D) negativo y no haya suficiente sangre, se debe de transfundir sangre O Rho (D) positivo y dejar las unidades Rho negativas para cuando se estabiliza el paciente.

A continuación, en los cuadros N° 1 al N° 5 se hace un breve resumen de sobre el manejo de la sangre y sus componentes y los esquemas de transfusión.

Cuadro N° 1. Manejo de sangre y sus componentes en el banco de sangre		
Periodos de almacenamiento		
Componente	Temperatura	Vencimiento
•γ Glóbulos rojos	4 °C	21-42 días
•γ Sangre total	4 °C	21-42 días
•γ Plasma fresco	-30 °C	12 meses
•γ Plasma humano	-30 °C	5 años
•γ Plasma fresco descongelado	4 °C	4 horas
•γ Plasma humano descongelado	4 °C	7 días
•γ Crioprecipitados	-30 °C	12 meses
•γ Plaquetas	20 °C	5 días

Cuadro N° 2. Esquema de transfusión de glóbulos rojos empacados, según grupo ABO del donante				
Grupo ABO del paciente	Grupo ABO del donador			
	Opción 1	Opción 2	Opción 3	Opción 4
O	O	-	-	-
A	A	O	-	-
B	B	O	-	-
AB	AB	A	B	O

Cuadro N° 3. Esquema de transfusión de plasma, según grupo ABO del donante				
Grupo ABO del paciente	Grupo ABO del donador			
	Opción 1	Opción 2	Opción 3	Opción 4
O	O	A	B	AB
A	A	AB	-	-
B	B	AB	-	-
AB	AB	-	-	-

Cuadro N° 4. Esquema de transfusión de plaquetas, según grupo ABO del donante				
Grupo ABO del paciente	Grupo ABO del donador			
	Opción 1	Opción 2	Opción 3	Opción 4
O	O	A	B	AB
A	A	O *	B**	-
B	B	O *	A**	-
AB	AB	O *	A*	B*

* Plaquetas lavadas.

** Se utilizarán solo en caso de no disponer de las opciones 1 o 2, en situaciones de sangrado, debido a que puede generar transfusiones no efectivas.

Cuadro N° 5. Esquema de transfusión de glóbulos rojos, según Rh del donante		
Rh del paciente	Rh del donador	
	Opción 1	Opción 2
Rh positivo	Rh positivo	Rh negativo
Rh negativo	Rh negativo	-

Nota: Para la transfusión de crioprecipitados, no se requiere compatibilidad sanguínea entre el paciente y el donador.

MANEJO DE SANGRE Y SUS COMPONENTES EN EL SERVICIO DE ENFERMERÍA O EN SALA DE OPERACIONES

Al llegar el hemocomponente al servicio, el profesional en enfermería a cargo del paciente debe confirmar los datos de la bolsa y los de ese paciente. No debe existir ninguna discrepancia que ponga en duda la identidad del receptor.

En una transfusión normal debe utilizarse al menos el filtro regular de 200 u. Estos filtros serán útiles para la retención de coágulos. En los casos de pacientes trasplantados, inmunodeficientes o con reacciones transfusionales no hemolíticas, la sangre debe administrarse utilizando filtros leucorreductores; idealmente este proceso debe ser realizado por el banco de sangre.

No debe administrarse ningún medicamento o solución por la misma vía que se administra la sangre o hemocomponentes. Solo se permite salina estéril al 0,9%.

Todas las unidades deben inspeccionarse por hemólisis, coágulos, grumos, cambio de color y formación de gas.

Exceptuando las situaciones en las que la condición clínica del paciente indique lo contrario, se debe realizar la transfusión a una velocidad de infusión de 5 ml/minuto, en los primeros 15 minutos. El tiempo recomendado de transfusión es de dos horas (no debe demorar más de cuatro horas). El tiempo más prolongado aplica para pacientes cardiopatas o nefrópatas, quienes tienen dificultad para el manejo del volumen. En estos pacientes la segunda unidad, en caso que lo requiera, debe ser transfundida poniendo un plazo entre transfusiones de veinticuatro horas. El servicio que transfunde las unidades debe solicitarlas una a una, con el objetivo de respetar las temperaturas de almacenamiento. Ante una reacción adversa se debe cerrar la infusión, efectuar una valoración médica y hacer un reporte al banco de sangre.

RIESGOS CLÍNICOS DE LA TRANSFUSIÓN

La transfusión sanguínea conlleva una serie de problemas iatrogénicos, sobre todo cuando se requiere politransfundir a un paciente por su condición de fondo.

Los efectos desfavorables de la administración aguda o crónica de sangre son diferentes.

Transfusión masiva

Se define como transfusión masiva aquella donde el receptor recibe más de ocho unidades en 24 horas. Entre los efectos adversos que se pueden presentar están:

- Hipotermia.
- Hipocalemia.
- Hipopotasemia.
- Acidosis láctica.
- Trombocitopenia.

Transfusión crónica

Los efectos desfavorables que pueden presentarse con la transfusión crónica son:

1. **Sobrecarga de hierro** (cada unidad de eritrocitos proporciona unos 250 mg de este metal). Esta acumulación se produce en diferentes tejidos, generando retraso del crecimiento, hepatomegalia, esplenomegalia, insuficiencia cardíaca, alteraciones endocrinas —como diabetes—, hipotiroidismo, etc. La hemocromatosis transfusional puede prevenirse con el uso de agentes quelantes del hierro; por lo general, se dispone de este medicamento por vía intravenosa, pero recientemente se ha lanzado uno para administrar por vía oral, facilitando su administración.
2. **Transmisión de infecciones.** La sangre total, sus componentes o los derivados plasmáticos, pueden

servir de vehículo a una serie de enfermedades de etiología infecciosa, en las que el donador es portador de la infección durante el conocido fenómeno "de ventana"; es decir, aquella condición del donador de poder transmitir estas enfermedades, aun cuando sea seronegativo. En el caso de la hepatitis, se ha demostrado esta condición en periodos variables de una a seis semanas, antes de tornarse el donador seropositivo. En el caso de la infección por VIH, esta condición se ha visto en periodos de hasta cuatro semanas. Lo anterior representa un ejemplo de la importancia que tiene la entrevista del donador, pues constituye el primer paso, y tal vez el más importante, para rechazar donantes con riesgo potencial. Se han reconocido otras enfermedades transmisibles por la sangre, como: paludismo, sífilis, filariasis, toxoplasmosis, *Leishmaniasis* (Kala-azar), mononucleosis infecciosa, brucelosis y citomegalovirus.

3. *Reacciones hemolíticas*: pueden ser intra o extravasculares. Las intravasculares son las más graves; generalmente corresponden a errores ABO y están asociadas a mala identificación del paciente durante la toma de la muestra o la infusión de la sangre. Las extravasculares tienen mejor pronóstico y están relacionadas con otros grupos sanguíneos.
4. *Reacciones febriles no hemolíticas*: la etiología de estos cuadros se asocia a anticuerpos anti leucocitos, en especial antígenos HLA, o a la activación de los leucocitos y la subsecuente generación de interleucinas, inductoras de fiebre. En este apartado no se puede excluir la fiebre causada por la endotoxina bacteriana, cuando durante la toma de la donación el sitio de punción no ha sido efectivamente preparado.
5. *Reacción alérgica*: la aparición de cuadros urticariformes, con eritema, formación de ronchas y prurito es una de las reacciones más frecuentes durante la transfusión. La etiología está asociada a anticuerpos anti proteínas. La clínica puede ser más intensa, con cuadros de diarrea, broncoespasmo, edema laríngeo y llegar a choque anafiláctico. Estos últimos casos se presentan con mayor frecuencia en pacientes deficientes de IgA.
6. *Enfermedad injerto versus huésped*: ocurre cuando los linfocitos inmunocompetentes ingresan al receptor y gobiernan el sistema inmune, rechazando los órganos del mismo paciente. Se presenta en inmunocomprometidos o en receptores de sangre de donadores con primer grado de consanguinidad. Las manifestaciones de rechazo se dan en la piel,

el hígado y el intestino. Requieren de una batería de inmunosupresores como tratamiento.

7. *Lesión pulmonar asociada a la transfusión*: cuadro de insuficiencia respiratoria aguda, en pacientes con adecuado gasto cardíaco, después de una transfusión. El infiltrado pulmonar corresponde a una lesión inmunológica, donde los complejos se alojan a nivel de los capilares pulmonares. El paciente suele requerir ventilación mecánica y el cuadro es autolimitado, cuando se atiende adecuadamente.
8. *Contaminación bacteriana*: este tipo de contaminación suele ocurrir durante la flebotomía del donador, si la limpieza no fue suficiente. Se relaciona más con la utilización de plaquetas, dado a que el almacenamiento de estas se da a 20 °C, condición que favorece el crecimiento bacteriano. Los géneros de cocos Gram positivos son los más frecuentes; sin embargo, esto no descarta la posibilidad de tener cuadros asociados a Gram negativos.

Con el desarrollo de la computación, el trabajo de correlacionar datos de laboratorio con los estudios del donador y receptor, la automatización de grupos sanguíneos, la identificación de donadores con sus características serológicas, entre otros, ha permitido que los bancos de sangre que manejan pequeños o grandes volúmenes de sangre mejoren su rendimiento. Además, con ello se asegura, al igual que con los métodos manuales, un menor riesgo para el paciente a transfundir.

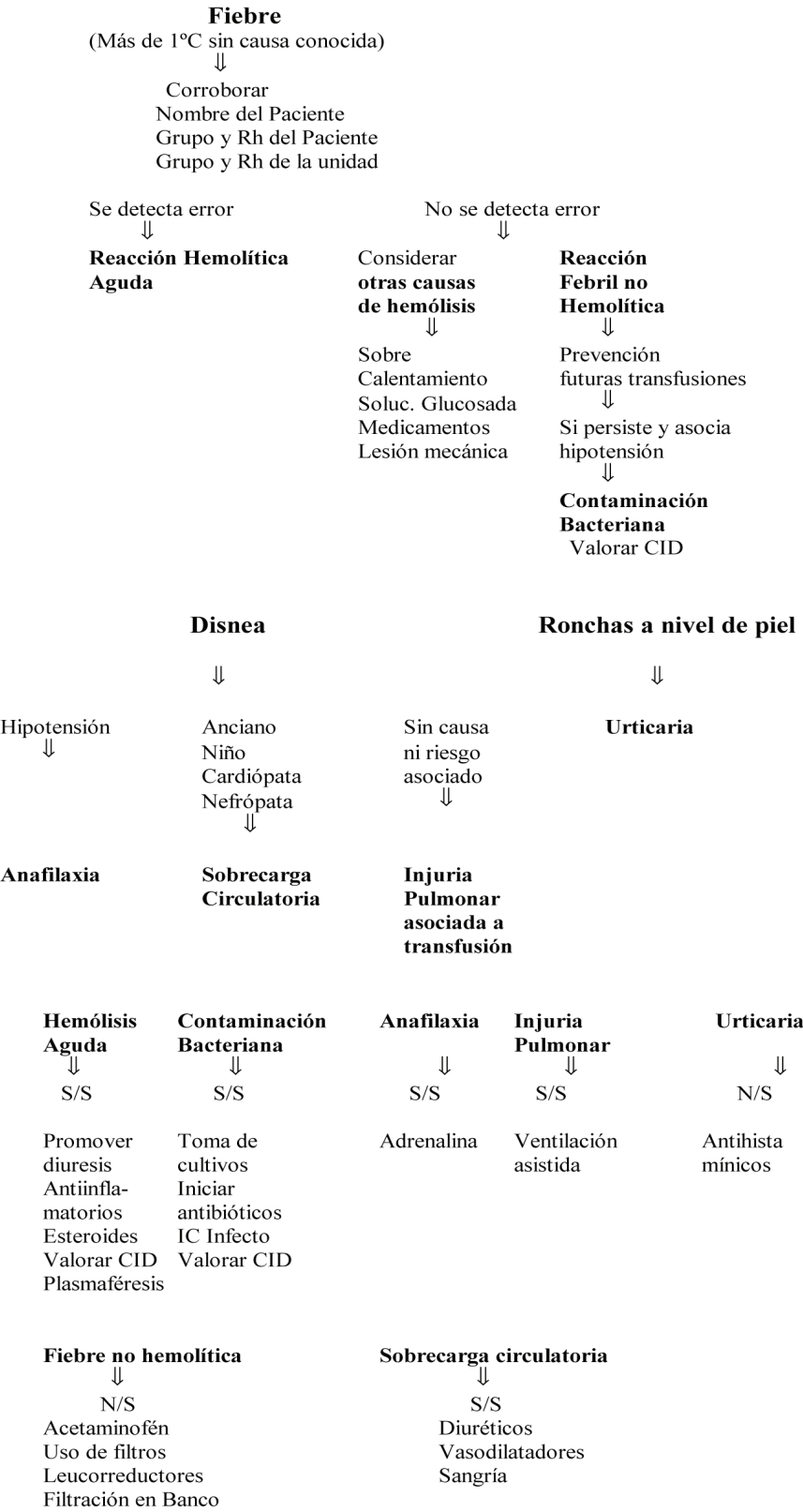


Figura N° 1. Flujograma para detectar reacciones transfusionales.

BIBLIOGRAFÍA

Asociación Americana de Bancos de Sangre. Manual técnico. 17 ed. Bethesda MD: American Association of Blood Bank; 2013.

Carson JL, Grossman BJ, Kleinman S, Tinmouth AT, Marques MB, Fung MK, *et al.* Red blood cell transfusion: a clinical practice guideline from the AABB. *Ann Intern Med* 2012; 157(1): 49-58.

Cortes A. Aplicaciones y práctica de la medicina transfusional. Colombia: Grupo Cooperativo Iberoamericano de Medicina Transfusional; 2013.

Organización Panamericana de la Salud. Elegibilidad para la donación de sangre. Recomendaciones para la educación y la selección de donantes potenciales de sangre. Washington DC: OPS/OMS; 2009.

Schwartz J, Winters JL, Padmanabhan A, Balogun RA, Delaney M, Linenberger ML, *et al.* Guidelines on the use of therapeutic apheresis in clinical practice evidence based approach from the writing Committee of the American Society for Apheresis: the sixth special issue. *J Clin Apher* 2013; 28(3): 145-284.

Sihler K, Napolitano L. Complications of massive transfusion. *Chest* 2010; 137(1): 209-220.

Dr. Evan B. Jensen Gamboa
Dra. Berta E. Valverde Rojas

INTRODUCCIÓN

En los últimos años el diagnóstico clínico ha experimentado un cambio radical, gracias al avance en diferentes áreas de la biomedicina; una de ellas ha sido la citometría de flujo (CF), que surgió del trabajo de ingenieros y biólogos visionarios, y que en la actualidad, junto con el avance en la producción de anticuerpos monoclonales, la química fluorescente, la fibra óptica y, por supuesto, la informática, constituye una tecnología indispensable en el área de la biología y la medicina clínica.

Entre las características de la CF que le confieren este increíble posicionamiento en el área del diagnóstico clínico, se encuentran su método de análisis, la separación de células, así como la gran objetividad, sensibilidad y rapidez que permite estudiar las células como nunca antes se había logrado; ya que de manera simultánea se pueden estudiar varias líneas celulares y de cada una de ellas diversas características a la vez. Por esta razón, en muchos lugares le han comenzado a llamar “el nuevo microscopio”.

FUNDAMENTOS DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO

El principio en que se basa esta tecnología es simple: hacer pasar células en suspensión y de manera alineada de una en una, a través de un haz luminoso; de esa interacción se genera una señal en forma de luz, que va a tener una duración y una intensidad definidas. Es decir, las células en su recorrido son interceptadas por la luz del láser y ese haz de luz puede cambiar de dirección y emitir luz de un color distinto. La dispersión de la luz refleja parámetros relacionados con el aspecto morfológico de la célula, o sea, el tamaño o “*Forward Scatter*” y la complejidad interna o “*Side Scatter*”. De esta manera, la célula de mayor tamaño generará una mayor señal y aquella con una complejidad interna mayor (como gránulos de un eosinófilo vs linfocito) manifestará una mayor dispersión de luz.

Por otro lado, la luz emitida por los fluorocromos se asocia a la presencia de sustancias que se unen a anticuerpos monoclonales y que identifican a alguna proteína en la superficie de las células o en el interior de estas. Al incidir el rayo láser sobre los fluorocromos, se excita la molécula a niveles energéticos inestables, los cuales volverán a su estado basal emitiendo luz a una longitud de onda determinada (Figura N° 1).

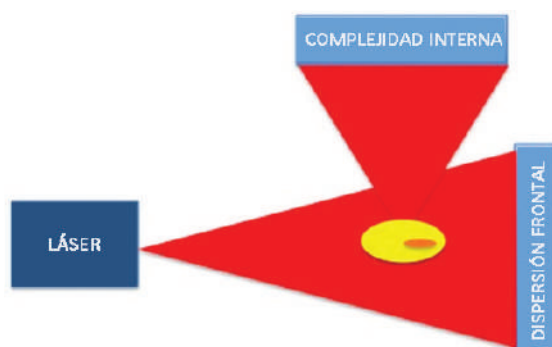


Figura N° 1. Representación esquemática de la generación de las señales de tamaño (dispersión frontal) y granularidad (complejidad interna celular).

La interacción de las células y de los fluorocromos con el láser genera señales que son leídas por un detector. Estas se transforman en impulsos eléctricos que se amplifican y se convierten en señales digitales, que

serán analizadas en una computadora, para finalmente obtener un diagrama de puntos o “*Dot plot*”, en el cual cada célula es representada por un punto (Figura N° 2).

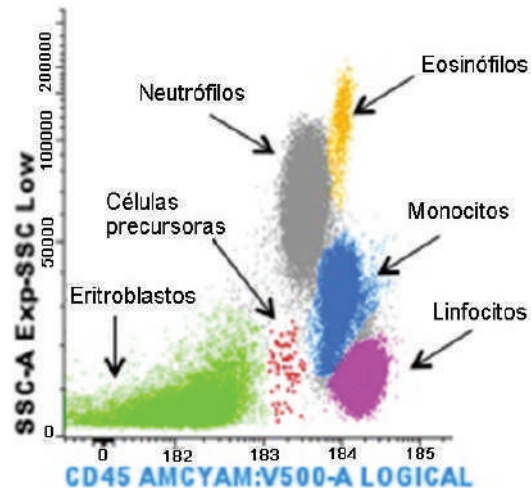


Figura N° 2. Representación de un diagrama de puntos o “Dot plot” de una médula ósea con las poblaciones hematológicas, utilizando un marcador pan-leucocitario CD45.

VENTAJAS Y DESVENTAJAS

Con respecto a otras técnicas de análisis celular, la citometría posee la característica de estudiar de manera íntegra a la célula; es decir, a diferencia de la biología molecular o de la citogenética, no extrae material de la célula (ADN, ARN), si no que la estudia de forma completa.

Además, su velocidad de respuesta es muy alta; la mayoría de los resultados se pueden obtener el mismo

día, en comparación con otros métodos de análisis celular (patología) que pueden durar hasta semanas. Esta ventaja le permite a la citometría posicionarse en algunas ocasiones como técnica de primera línea para el diagnóstico hematológico.

Cabe señalar que una de sus desventajas es la pérdida de información acerca de la localización anatómica de las células, debido a la necesidad de obtener las células en suspensión.

Cuadro N° 1. Comparación entre las diferentes técnicas utilizadas en la actualidad para el análisis celular

Característica	Morfología (patología)	Citometría de flujo	Biología molecular
Sensibilidad	Baja	Alta	Alta
Rapidez	Baja	Alta	Baja
Tipo de información	Cualitativa	Cuantitativa y cualitativa	Cuantitativa
Información basada en	Célula a célula	Célula a célula	Media de la muestra
Localización anatómica	Alta	Baja	Baja

MUESTRAS A PROCESAR

La mayoría de muestras que se procesan en un estudio por citometría son de tipo biológico y en estado líquido. Es por ello que las que más se reciben son médula ósea y sangre periférica, aunque también se pueden estudiar líquidos cefalorraquídeos, líquidos pleurales y punciones por aspirado con aguja fina (PAAF), entre otros.

Mención aparte requiere aquel tipo de muestras cuyo estado es sólido, como ganglios, biopsia de piel e hígado. En este caso se realiza un proceso mecánico de maceración, para lograr obtener una suspensión de las células que ahí se encuentran.

En el Cuadro N° 2 se mencionan algunos de los cuidados que se deben tener para el correcto envío de la muestra y su almacenamiento.

Cuadro N° 2. Indicaciones para el correcto envío y almacenamiento de la muestra				
Tipo de muestra	Recolección	Cantidad mínima de muestra**	Transporte*	Almacenamiento
Médula ósea	Tubo con EDTA	1 ml	24 horas	Refrigeración 4-8 °C
Sangre periférica	Tubo con EDTA	1 ml	24 horas	Refrigeración 4-8 °C
Líquido cefalorraquídeo; PAAF; líquido pleural; etc.	Tubo sin anticoagulante o con EDTA	3 ml	1 hora	Temperatura ambiente
Ganglios; biopsias; etc.	Suero fisiológico, solución salina ***	NA	1 hora	Temperatura ambiente

NA: no aplica; PAAF: punción aspirado con aguja fina.

* La cantidad mínima es un criterio que puede variar, ya que en la práctica se sabe que no siempre se pueden conseguir esos volúmenes; con esta cantidad nos aseguramos que aunque sea una muestra con muy baja celularidad, como el líquido cefalorraquídeo, se pueda realizar al menos un análisis presuntivo.

** Tiempo ideal de llegada al laboratorio de citometría.

*** En este punto es importante recalcar que no se procesaran las muestras que provengan con formalina, ya que la marcación por medio de anticuerpos es totalmente afuncional en este tipo de muestras.

APLICACIÓN EN LA HEMATOLOGÍA

Para ubicar a la citometría en el contexto del diagnóstico hematológico, se debe percibir como una técnica especializada; es decir, su empleo se debe decidir sobre la base de una sospecha clínica y un hallazgo de laboratorio sugerentes de una neoplasia hematológica. Producto del suministro de resultados en poco tiempo, esta técnica funciona como filtro orientativo para las pruebas que se deben realizar en áreas de la biología molecular para la determinación de anomalías específicas, ya sea por biología molecular o por citogenética.

La aplicación que posee la citometría en la hematología se puede englobar en tres grandes áreas:

1. Diagnóstico.
2. Clasificación de las hemopatías.
3. Estudio de la efectividad del tratamiento.

Diagnóstico

Sobre la utilidad de la citometría para el diagnóstico hematológico, es indispensable que el investigador que está efectuando el análisis posea un conocimiento profundo de la ontogenia de la hematopoyesis; es decir, debe tener la capacidad de distinguir desde una célula inmadura como la progenitora (*Stem Cell*), hasta una etapa totalmente diferenciada como es un

neutrófilo o un linfocito. Al igual, debe entender cómo se lleva a cabo la maduración, a partir de qué precursor se diferencian y los porcentajes normales de acuerdo a su etapa de maduración, entre otros aspectos. Para ello, el citometrista emplea una gran cantidad de anticuerpos monoclonales, para dar seguimiento a la diferenciación celular, lo que le permite visualizar los diferentes estadios de las líneas celulares hematológicas. Gracias a eso se ha confirmado la gran heterogeneidad de los precursores hematopoyéticos, demostrando que las modificaciones en la expresión de los antígenos de diferenciación conlleva cambios morfológicos. Esto ha permitido establecer patrones normales de maduración (como el que se observa en la Figura N° 3), lo que facilita distinguir entre un proceso reactivo o un proceso clonal neoplásico.

Linfocitos B diferenciación

Los linfocitos B se originan en la médula ósea, y en ella se pueden reconocer algunas de las etapas de su maduración; por ejemplo, las células pre B, precursores que todavía no presentan la inmunoglobulina de superficie; las células B, células maduras inmunocompetentes que expresan inmunoglobulina de superficie (slg); y células plasmáticas, células de estirpe B totalmente diferenciadas, que han perdido la inmunoglobulina de superficie y funcionan para producir inmunoglobulinas en cantidades masivas.

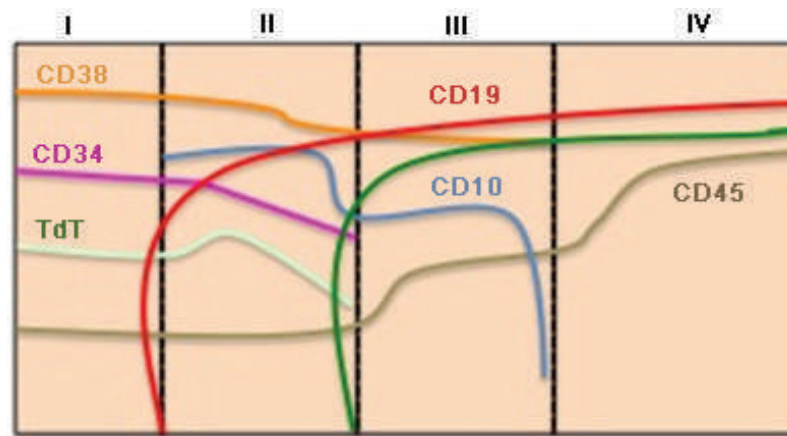


Figura N° 3. Esquema normal del patrón de maduración para la línea del linfocito B que se realiza en la médula ósea para diferentes proteínas (posee cuatro estadios diferentes de maduración).

El desarrollo de sus marcadores de superficie es el siguiente: los precursores más inmaduros expresan solo CD34, HLA-DR y CD22, mientras que el antígeno CD19 se expresa de manera precoz en el desarrollo de la célula B y continúa su expresión hasta la diferenciación a células plasmáticas. El CD20 se expresa más tardíamente que el CD19 en la maduración y parece estar relacionado con la expresión de cadenas pesadas citoplasmáticas.

En lo que respecta al antígeno CD10, se reconoce su importancia por su presentación en etapas tempranas y ausencia en la etapa madura. A esta endopeptidasa se le conoce también como antígeno "CALLA", por sus siglas en inglés (*Common Acute Lymphoblastic Leukemia Antigen*), y su expresión en los blastos se utiliza para la clasificación de leucemias de estirpe B (Figura N° 3).

Linfocitos T

Los precursores linfoides T se originan en la médula ósea, desde donde migran hasta el timo para su diferenciación. El esquema que se acepta en la actualidad divide a las células T inmaduras (timocitos) en tres estadios, en los que la citometría de flujo ha desempeñado un papel fundamental. El protimocito posee CD7, CD38 y CD71. Los timocitos precoces (estadio I) expresan CD2 y CD5, además de CD7, CD38 y CD71. Al desarrollarse las células en timocitos comunes (estadio II) adquieren CD1a, CD4 y CD8. En esta fase la molécula CD3 se encuentra en el citoplasma y no se expresa en la superficie. Finalmente, luego de la selección negativa y positiva que sufren los linfocitos en el timo, las células que salen de este son linfocitos T colaboradores (CD4+) y linfocitos T citotóxicos (CD8+). Estas células presentan ya en superficie el

CD3 y pierden parte de la reactividad para el antígeno CD38. Dentro de estas poblaciones maduras se pueden distinguir subpoblaciones linfocitarias, como las células T CD4+ de memoria e inductoras de supresión que expresan CD45RO, o vírgenes cuando expresan CD45RA. De forma semejante, los linfocitos CD8+ pueden subdividirse en el conjunto supresor que expresa CD11b y el conjunto citotóxico que no expresa CD11b.

Células natural killer (NK)

Las células NK se originan a partir de un precursor hematopoyético en la médula ósea, donde maduran y luego pasan a la circulación. Si bien su proceso de diferenciación es parcialmente desconocido, gracias a la citometría se ha logrado caracterizarlas, y se sabe que expresan los marcadores CD2 y CD7, así como CD16, CD56 y CD57.

Células mieloides

Los precursores mieloides expresan de manera general CD34, HLA-DR, CD117 y CD33; es por ello que el precursor monocitoide más inmaduro (monoblasto) no puede ser distinguido del precursor de línea granulocítica (mieloblasto). Conforme se van diferenciando van perdiendo o adquiriendo antígenos más específicos de línea, como la mieloperoxidasa en los granulocitos o el CD14 para la serie monocitoide. En las figuras N° 4 y N° 5 se pueden ver los diferentes estadios de diferenciación y los antígenos que presentan las distintas líneas madurativas granulocíticas y monocitoides.

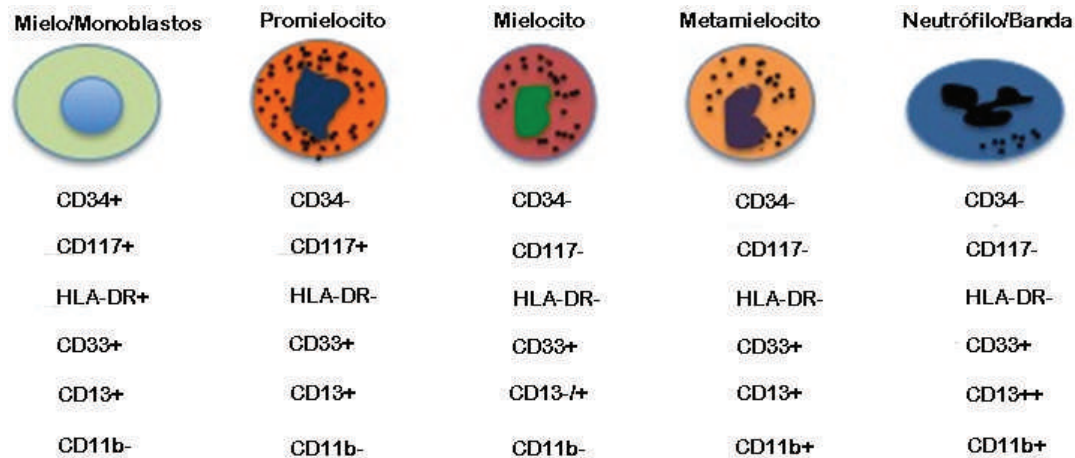


Figura N° 4. Expresión normal de antígenos de superficie en la diferenciación de la línea granulocítica en médula ósea.

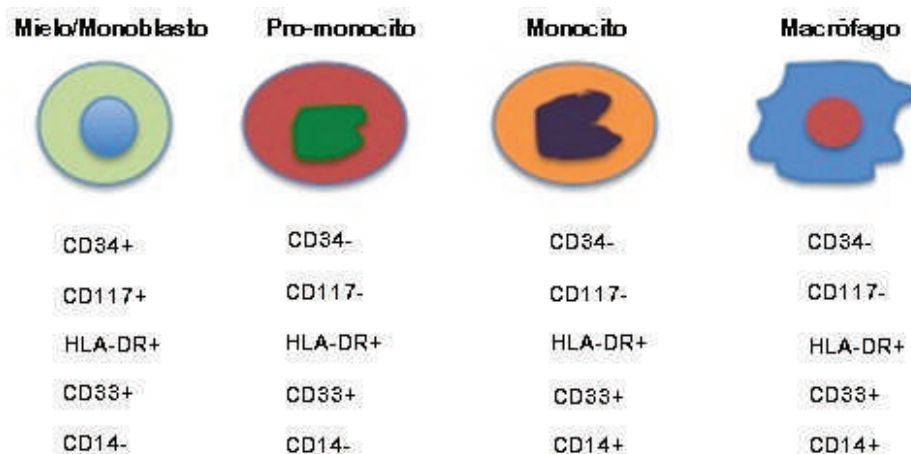


Figura N° 5. Expresión normal de antígenos de superficie en la diferenciación de la línea monocítica en médula ósea.

Plaquetas

Los antígenos de superficie de las plaquetas se definieron bioquímicamente antes de contar con anticuerpos dirigidos a ellos. La mayoría de las glicoproteínas de las plaquetas son heterodímeros que actúan como receptores de diversos ligandos y que participan en la activación, adhesión o agregación plaquetaria. Dentro de estos, los antígenos más característicos son CD61 (gpIIa), CD41 (gpIIb/IIIa) y CD42 (gpIb/IX).

Serie eritroide

En los estudios por citometría de flujo para el análisis leucocitario se lisan las células no nucleadas con cloruro de amonio; por tanto, el estudio antigénico se realiza en la membrana de los eritroblastos. En médula ósea se pueden distinguir inmunofenotípicamente los

pro-eritroblastos que expresan el CD45 de forma débil, el CD117 y el CD71 (receptor transferrina).

Los eritroblastos se caracterizan por la pérdida de CD45 y CD117, así como por el aumento de expresión de CD71 y la ganancia de CD235a (glicoforina).

Clasificación de las hemopatías

En la clasificación de las diversas neoplasias hematológicas, la citometría de flujo ayuda a diferenciar entre las distintas líneas celulares que componen nuestro organismo, resultando sencillo reconocer la diferencia entre una leucemia aguda linfóide B o T (lo cual es imposible por morfología) o determinar con gran exactitud los distintos tipos de leucemias mieloides agudas. Además, la CF contribuye a detectar aberraciones fenotípicas, tales como:

- a) Ausencia de un marcador.
- b) Sobreexpresión de un antígeno.
- c) Infidelidad de línea (expresión de un antígeno mieloide en una célula linfoides o viceversa).
- d) Marcación ectópica (presentación de un antígeno inmaduro en una célula totalmente diferenciada).

Tomando en cuenta estos criterios, se puede explicar la metodología de análisis, donde lo que se busca es detectar estas anomalías y con ello identificar la presencia de células en los sitios en los cuales no deberían de existir, es decir, lo que se conoce en esta área como las “ventanas vacías” (Figura N° 6).

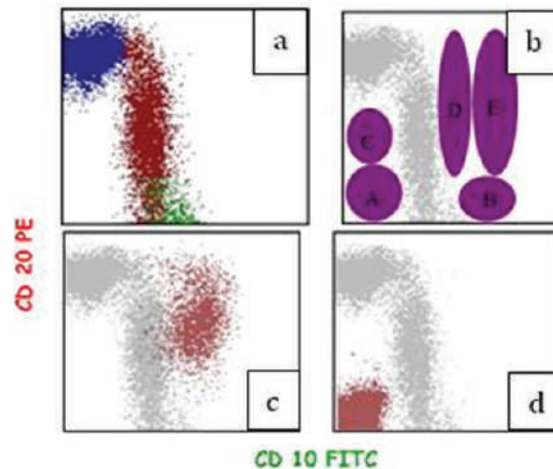


Figura N° 6. a) Diagrama de puntos donde se muestra el camino normal de la maduración para la línea linfocítica B con el uso de dos marcadores CD10 y CD20. b) Espacios donde no se deben observar células de acuerdo al patrón de maduración establecido. c) Se identifican blastos linfocíticos B (puntos rosados) que sobreexpresan el marcador CD10 (aberración fenotípica) propios de una leucemia linfocítica B común. d) Se observan blastos linfocíticos B (puntos rosados) con ausencia de los dos marcadores enunciados, estableciendo una aberración por ausencia de marcador; este caso sería la presencia de blastos B de una leucemia linfocítica B nula.

Leucemias agudas

Los dos grupos principales de leucemias agudas son la leucemia linfoblástica aguda (LLA) y la leucemia mieloblástica aguda (LMA). Las LLA pueden identificarse mediante CF utilizando marcadores inmunológicos en LLA-T (cyCD3 y CD7 positivos) y LLA-B (cyCD79 y CD19 positivos).

Los anticuerpos monoclonales CD7, CD5 y CD2 son los marcadores más sensibles que reaccionan con los blastos leucémicos de las LLA-T. Estas pueden clasificarse en cuatro subgrupos: Pro-T (CD1a-, CD3-, CD2-, CD5-, CD8-), Pre-T (CD2+ y/o CD5+ y/o CD8+ con CD1a-, CD3-), T corticales (CD1a+, CD3+) y T maduras (CD3+). Las LLA-B pueden subdividirse en cuatro grupos principales: Pro B (CD10-), comunes (CD10+, clg-, slg-), Pre B (cyIg+, slg-) y las B maduras (slg+).

Con relación a las LMA, la relevancia de la citometría es enorme, porque puede reconocer la mayoría de las diferentes leucemias, según sea su línea, ya que se

cuenta con una gran cantidad de marcadores para su estudio. Identificar leucemias de estirpe megacario-blastica o la variante microgranular de los casos de leucemia promielocítica aguda, en las que el diagnóstico final puede no ser del todo claro desde el punto de vista morfológico, es de gran utilidad, dado el alto riesgo de sangrado.

En la actualidad, para la definición de línea en las leucemias agudas, se sugiere la utilización de un panel de marcadores en el que se incluyen anticuerpos frente a antígenos con diferentes grados de especificidad para cada línea. La expresión de mieloperoxidasa (MPO), CD22/CD79a y CD3/TCR constituyen los marcadores de mayor especificidad para la línea mieloide, linfocítica B y linfocítica T, respectivamente. Sin embargo, ninguno de ellos por sí solo permite asegurar el origen celular de los blastos. En este sentido, los avances técnicos han permitido el marcaje de antígenos intracelulares como TdT, MPO, CD22 y CD3, los cuales han sido de vital importancia. A todo ello hay que añadir la información proporcionada por los parámetros de dispersión de luz (tamaño y complejidad interna), que ayudan a

establecer la correlación que existe entre las características morfológicas y fenotípicas de las células blásticas.

El análisis multiparamétrico permite discriminar los casos en los que las células expresan antígenos de líneas diferentes (leucemias bifenotípicas) en un mismo clon leucémico, de los que realmente tienen dos poblaciones distintas (leucemias bilineales), hoy agrupadas bajo el término leucemias agudas mixtas.

Por otra parte, con el desarrollo de nuevos anticuerpos monoclonales, ha sido posible la clasificación de otros tipos de leucemias que no estaban definidas, como la leucemia de células dendríticas (de muy difícil diagnóstico), lográndose determinar su precursor y establecer un patrón fenotípico característico de estas células, lo que las hace fácilmente detectables por CF.

Enfermedades linfoproliferativas crónicas

El estudio de síndromes linfoproliferativos crónicos posee una relevancia especial, ya que con este se logra una clasificación rápida entre linfocitos reactivos versus un proceso monoclonal. En ese sentido, el inmunofenotipo permite clasificar los síndromes linfoproliferativos crónicos de origen B, T o NK. Dentro de cada uno de ellos se han definido subgrupos fenotípicamente diferentes, con características clínico-biológicas específicas. A modo de ejemplo, dentro de los síndromes linfoproliferativos crónicos se encuentra la leucemia linfática crónica B, que se caracteriza por presentar una infiltración masiva en sangre periférica de células que expresan CD19, sIg, CD20 y CD22 con intensidad inferior a linfocitos B maduros normales; además expresan aberrantemente el CD5 y con muy buena intensidad el CD23; asimismo, carecen de reactividad para los antígenos FMC7, CD10 y CD103.

A su vez, la expresión de CD10 dentro de los síndromes linfoproliferativos leucémicos se relaciona con los linfomas centrofoliculares. Por el contrario, la reactividad para otros marcadores como CD25 y CD11c, que en un principio se asoció con determinados subgrupos de síndromes linfoproliferativos B, se reconoce en la actualidad que no es tan específica, pudiendo presentarse en casi la totalidad de los subtipos antes mencionados.

Síndromes mielodisplásicos (SMD) y mieloproliferativos

En años recientes, el aporte de la CF para el estudio de los SMD se ha multiplicado, por cuanto la determinación de anomalías fenotípicas se ha correlacionado con la morfología, en la subclasificación y

pronóstico de estas patologías. Las anomalías más estudiadas o mejor establecidas son: cuantificación de blastos, ausencia de precursores linfoides, disminución de la granularidad en elementos maduros, asincronismos en la expresión de los marcadores asociados a maduración, ausencia o disminución de la expresión de los marcadores CD13 y CD33 en poblaciones granulocíticas, así como la expresión aberrante de CD56 en la serie monocitoide. Es por esto que hoy en día el papel de la CF se ha convertido en un criterio indispensable para la clasificación de los SMD.

En lo que respecta a los síndromes mieloproliferativos, su contribución es válida para determinar transformaciones a procesos agudos (leucemias) e identificar patrones de maduración con desviaciones a la izquierda, característicos de una mieloide crónica. Además, es sumamente útil para la identificación de monocitos maduros patológicos en las leucemias mielomonocíticas crónicas.

Hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN)

La HPN es un desorden genético adquirido a nivel de las células madres hematopoyéticas, que provocan que los glóbulos rojos sean susceptibles a la acción de lisis por parte del complemento. La anomalía genética implica la alteración en el gen ligado al cromosoma X *pig-A*, lo que genera una deficiencia funcional del anclaje glicosil-fosfatidilinositol (GPI) a ciertas proteínas en la membrana celular. Entre las principales proteínas de membrana relacionadas al GPI destacan: CD59, CD55, CD14 y CD16. La pérdida de CD55 y CD59 en los glóbulos rojos es el causante de susceptibilidad a la lisis por el complemento y como resultado se produce una anemia hemolítica intravascular, la cual es la principal manifestación clínica del HPN.

El análisis por CF puede determinar el grado de expresión de esas proteínas en membrana, para detectar aquellas células deficientes, que son las que presentan las características de la enfermedad. Por esta razón, la CF se ha convertido en el método de elección para su diagnóstico.

Estudio de la efectividad del tratamiento

La resistencia a los agentes terapéuticos es un factor muy importante en el fracaso de los tratamientos contra el cáncer. En las leucemias de células que son resistentes en la médula ósea o en la sangre periférica, constituyen la enfermedad mínima residual (EMR) y son detectadas por técnicas de muy alta sensibilidad. El empleo de la CF para el seguimiento terapéutico de las hemopatías malignas es uno de los mayores aportes a la clínica hematológica. La detección temprana

de estas células blásticas remanentes, permite la intervención clínica dirigida a revertir la proliferación de dichas células neoplásicas. Es por eso que la determinación precisa de la EMR puede mejorar en gran medida el tratamiento del paciente oncológico, al permitir estratificarlo en bajo o alto riesgo, según protocolos de tratamiento, para modificar los esquemas terapéuticos y lograr su beneficio, al intensificar el aporte de quimioterapia cuando se sospecha de resistencia.

En leucemias agudas, donde se han realizado la mayoría de estos estudios, se ha demostrado que la incidencia de fenotipos aberrantes es muy alta, inclusive se ha detectado más de una aberración inmunofenotípica en el 75% de los casos. Sin embargo, cabe destacar que la utilización de paneles de anticuerpos amplios al diagnóstico, permiten detectar clones leucémicos minoritarios, que muchas veces son descubiertos sin mayor problema en estudios de enfermedad mínima; caso contrario, con paneles de diagnóstico con pocos marcadores, se podrían dejar escapar estos pequeños clones, los cuales en un subsecuente estudio de seguimiento son los que se identifican en mayor porcentaje, llevando a la errónea conclusión de un cambio en el inmunofenotipo inicial. Es por eso que se utilizan diferentes combinaciones de marcaje con anticuerpos monoclonales, que ayuden a diferenciar entre células normales y células patológicas.

Los primeros estudios secuenciales en los que se analizó el valor de la EMR en leucemias agudas mediante CF, demostraron la importancia clínica de hacer este tipo de determinación en cualquier etapa de la evolución de la enfermedad, ya que por medio de esta técnica se puede llegar al diagnóstico precoz de recaídas,

con una elevada sensibilidad y especificidad. En leucemias se ha llegado a establecer puntos de corte, en donde para las LLA es de $< 0,01\%$ (en 10.000 células analizadas no se observaron células blásticas con valores menores al indicado), mientras que para las LMA es de $< 0,1\%$ (en 1.000 células estudiadas se encontraron menos de 0,1).

En la práctica esta sensibilidad es mucho mayor, llegando a analizar, cuando es posible (algunas muestras son pancitopénicas debido al tratamiento), más de dos millones de células; sin embargo, todavía se necesitan más estudios para saber qué relevancia clínica tendría obtener positividad de células malignas a estos niveles de cara al pronóstico de la evolución de la enfermedad.

OTRAS APLICACIONES

Estudio del ciclo celular

La cuantificación de ácidos nucleicos mediante el empleo de diferentes compuestos químicos fluorescentes capaces de unirse estequiometricamente con el ADN o ARN, representa, desde el punto de vista cronológico, una de las primeras aplicaciones de la CF.

Respecto a esta aplicación, la CF brinda información muy valiosa sobre dos aspectos específicos:

- La cuantificación del ADN o estudio del ciclo celular.
- La determinación de aneuploidias.

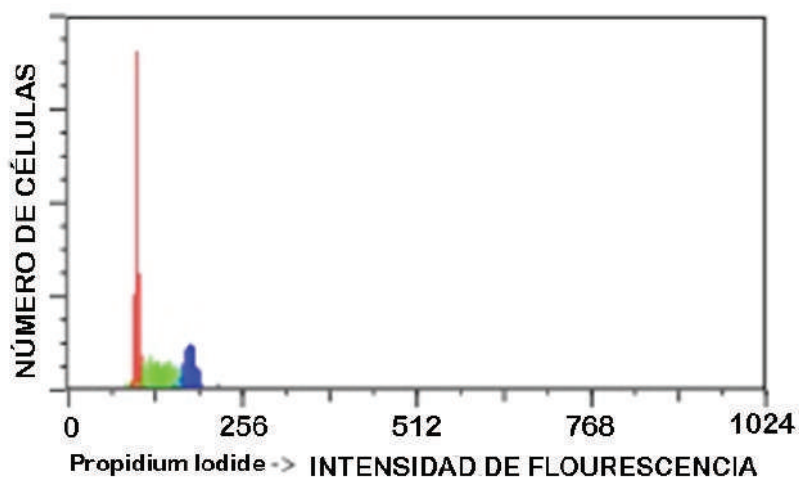


Figura N° 7. Histograma de ADN correspondiente a una médula ósea normal, donde se observa el ciclo celular; la fase G0/G1 (rojo) tiene la mayor cantidad de células, en comparación con las fases de síntesis (verde) y mitosis (azul); esta última es la que presenta mayor intensidad de fluorescencia, debido a la mayor cantidad de ADN.

En relación con el primero, desde el punto de vista clínico, la CF se ha centrado fundamentalmente en el estudio de las diferentes fases del ciclo celular (G0, G1, síntesis y mitosis); de las cuales revierte importancia la determinación de la fase de síntesis, ya que una tasa proliferativa alta en tumores sólidos y hemopatías malignas suele asociarse a un factor de mal pronóstico. Son excepción en estos casos los SMD, donde la existencia de una tasa de síntesis elevada se correlaciona con un mejor pronóstico (Figura N° 7).

En el caso de las aneuploidias, estas se definen como las alteraciones cuantitativas del ADN en las que las células denominadas aneuploides, muestran una cantidad de ADN distinta a la detectada en células normales diploides en la misma fase del ciclo celular. La alteración se produce por el exceso o la pérdida de

material cromosómico, y se denominan hiperploidia o hipoploidia de ADN, respectivamente.

Para medir la cuantía de la alteración, se ha acordado utilizar el término “índice de ADN” (IADN), el cual representa el cociente entre la cantidad de fluorescencia detectada para la media de las células problema en las fases G0/G1 del ciclo celular y la media de la fluorescencia obtenida para las células normales diploides en las mismas fases del ciclo celular. De tal forma, cuando el índice es igual a uno (picos de G0/G1 de células problemas coincidentes) se habla de diploidia de ADN y cuando es diferente de uno (aparición de dos picos de G0/G1 distintos) se habla de aneuploidia de ADN (Figura N° 8). En este supuesto, cuando el índice es > 1 se está ante una hiperploidia, y cuando es < 1 ante una hipoploidia.

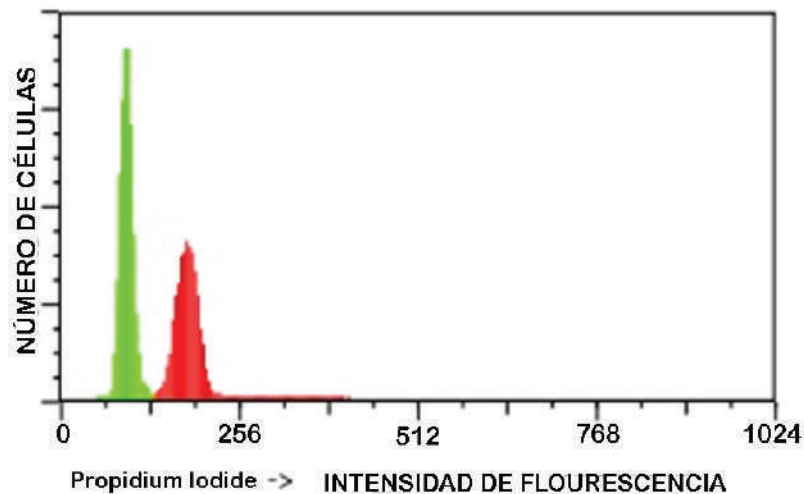


Figura N° 8. Histograma de ADN que corresponde a una muestra de médula ósea de un paciente con leucemia linfóide aguda con aneuploidia de ADN (células de color rojo); se observa la mayor intensidad de fluorescencia para estas células comparadas con las células diploides normales (color verde). El índice de ADN para este caso fue de: 2.00; un caso de hiperploidia.

En la parte clínica, detectar aneuploidias en neoplasias es una característica de mal pronóstico, a excepción de lesiones benignas de tiroides o gammapatías monoclonales, donde no es relevante. Entre las hemopatías malignas, la leucemia linfóide crónica B y las leucemias agudas mieloides son las que con menor frecuencia presentan aneuploidias de ADN por CF, contrastando con el mieloma múltiple, en el que se observa esta alteración en el 50-80% de los casos. Las leucemias linfoides y los linfomas no-Hodgkin B presentan incidencias intermedias.

No obstante, debe mencionarse que la detección de aneuploidias por CF es significativamente inferior a las detectadas por citogenética convencional; esto se debe a que en la mayoría de las alteraciones cromosómicas estructurales o numéricas equilibradas, donde la pérdida o ganancia de contenido de ADN no es significativo, son indetectables por CF. Por esa razón, para visualizar como aneuploides células portadoras de trisomía o monosomía 1, el coeficiente de variación obtenido para las células debería ser inferior al 2%, cifra que no siempre se alcanza.

BIBLIOGRAFÍA

Béné MC. Immunophenotyping of acute leukaemias. *Immunol Lett* 2005; 98(1): 9-21.

Coustan-Smith E, Sancho J, Hancock M, Boyett J, Behm F, Raimondi S, *et al.* Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2000; 96(8): 2691-2696.

Hernández-Campo PM, Almeida J, Sánchez ML, Malvezzi M, Orfao A. Normal patterns of expression of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins on different subsets of peripheral blood cells: a frame of reference for the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cytometry B Clin Cytom* 2006; 70(2): 71-81.

Küppers R. Mechanisms of B-Cell lymphoma pathogenesis. *Nature* 2005; 5(4): 251-262.

Lúcio P, Parreira A, van den Beemd MW, van Lochem EG, van Wering ER, Baars E, *et al.* Flow cytometric analysis of normal B cell differentiation: a frame of reference for the detection of minimal residual disease in precursor-B-ALL. *Leukemia* 1999; 13(3): 419-427.

Matarraz S, López A, Barrena S, Fernandez C, Jensen E, Flores-Montero J, *et al.* Bone marrow cells from myelodysplastic syndromes show altered immunophenotypic profiles that may contribute to the diagnosis and prognostic stratification of the disease: a pilot study on a series of 56 patients. *Cytometry B Clin Cytom* 2010; 78(3): 154-168.

Orfao A, González de Buitrago J. La citometría de flujo en el laboratorio clínico. Salamanca, España: Comité de Publicaciones de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular; 1995.

San Miguel JF, Vidriales MB, Orfao A. Immunological evaluation of minimal residual disease (MRD) in acute myeloid leukaemia (AML). *Best Pract Res Clin Haematol* 2002; 15(1): 105-118.

Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, *et al.* WHO classification of tumours of hematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: International agency for research on cancer; 2008.

van Lochem EG, van der Velden VH, Wind HK, te Marvelde JG, Westerdaal NA, van Dongen JJ. Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. *Cytometry B Clin Cytom* 2004; 60(1): 1-13.

CONCEPTOS BÁSICOS DE CITOGENÉTICA Y SUS APLICACIONES A LA HEMATOLOGÍA

Dra. Catalina Obando Jiménez
Dra. Patricia Venegas Barboza

HISTORIA DE LA CITOGENÉTICA

En 1956, un hallazgo afortunado permitió a Tjio y Levan descubrir que la célula humana contaba con 46 cromosomas. Ellos agregaron agua a una suspensión de células en mitosis y al observarla entre un portaobjetos y un cubreobjetos al microscopio, descubrieron que los cromosomas estaban separados; de esa forma trazaron el inicio de una nueva rama de la ciencia: la citogenética.

En los años siguientes, la citogenética humana se fue transformando por los avances tecnológicos moleculares, químicos, de instrumentación e informáticos; en su desarrollo desde la introducción del bandeo de los cromosomas hasta la técnica de hibridización *in situ* por fluorescencia (FISH), se logró el aumento en la resolución y en la sensibilidad de los cromosomas (10,000 veces), lo que ha permitido obtener información relevante del genoma, y a partir de ahí, poder asociar alteraciones genotípicas con un respectivo fenotipo y proveer información básica a los investigadores moleculares, para determinar los potenciales genes que podrían estar involucrados en una enfermedad específica.

El genoma humano haploide contiene alrededor de tres billones de pares de bases (pb) de ADN, acumulando hasta seis billones pb en un núcleo diploide humano. El genoma nuclear está dividido en 46 moléculas de una doble hebra de ADN, las cuales son visibles como cromosomas cuando se encuentra en el estado de metafase.

Afortunadamente, la diferencia entre el tamaño de los diversos cromosomas y la posición de los centrómeros, permitió separarlos por morfología a *grosso modo*: se emparejaron por 23 pares y se clasificaron en siete grupos (de la A a la G), lo cual permitió realizar algunos descubrimientos.

El poder de los análisis citogenéticos se dobló en 1960, cuando Torbjörn Caspersson desarrolló los protocolos de tinción, produciendo los patrones de bandas claras y oscuras a lo largo de la longitud de los cromosomas (técnicas de bandeo), permitiéndole a los citogenetistas identificar cada uno de los cromosomas, y con ello, poder detectar las alteraciones estructurales: deleciones, translocaciones, inserciones, inversiones, sitios frágiles y puntos de rupturas (*break points*). Además, en las numéricas permitió identificar la individualidad del cromosoma extra o ausente.

Cabe mencionar que el nivel de resolución (número de bandas) depende del momento en que se detenga la división celular. De tal forma, en estado de metafase solo pueden visualizarse alrededor de 400-800 bandas por set haploide, mientras que en los estados de condensación muy temprana, como la pro-metafase, pueden visualizarse más de 2.000 bandas (Figura N° 1). El nivel de cada banda se basa en el número total de bandas sobre cada cromosoma en el set haploide.

El nombre de cada banda se asignó en 1971, de acuerdo al nivel de resolución cuando el cromosoma era analizado.

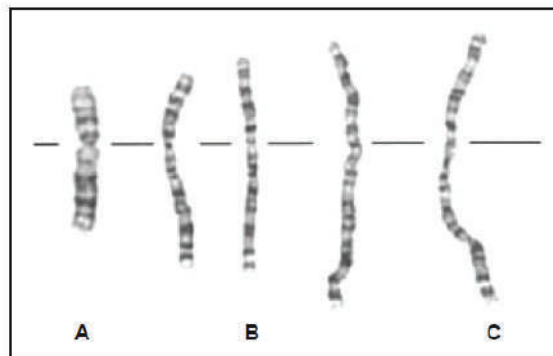


Figura N° 1. Cromosoma 2: patrón de bandas G en diferentes estados de condensación. El cromosoma A representa el nivel de 400 bandas; el cromosoma B el nivel de 550 bandas; y el cromosoma C de 850 bandas.

A partir del descubrimiento del cromosoma Philadelphia en la leucemia mieloide crónica en 1960, las investigaciones en el campo de la genética en Hemato-Oncología han relevado que las alteraciones cromosómicas no son al azar y más bien corresponden a un tipo específico de desórdenes hematológicos. Esto mismo sucede en los tumores sólidos.

ANATOMÍA CROMOSÓMICA

El término cromosoma fue establecido en 1888 por el analista y patólogo alemán Heinrich Wilhelm Gottfried Waldeyer, y se deriva de las palabras griegas *khroma* y *soma*, que significa “cuerpo coloreado”. Cada una de estas estructuras citológicas permite la ubicación física (locus) de los genes y el lugar donde el ADN se replica.

Durante la mitosis, los cromosomas se dividen y entregan una copia apropiada de material genético a sus células hijas (set diploide con 46 cromosomas). Durante la meiosis, los cromosomas homólogos intercambian material genético para permitir la recombinación genética y formar los gametos haploides (23 cromosomas).

En los diferentes estados del ciclo celular, los cromosomas se observan de forma distinta, según la condensación cromosómica. Al principio no presentan morfología individualizada (interfase); cuando empieza la condensación (inicia la división de la célula) en el estado de metafase, se puede ver la individualidad de cada uno de los cromosomas, los cuales en este estado presentan dos cromátides que están unidas por una estructura conocida como **centrómero**.

El centrómero separa cada uno de los cromosomas en un brazo corto (p-arm) y un brazo largo (q-arm). Esta anatomía (Figura N° 2) permite clasificarlos en:

- γ Metacéntricos: el centrómero aparece cerca o en el centro.
- γ Submetacéntricos: el centrómero está más cerca del final de los cromosomas.
- γ Acrocéntricos: el centrómero se encuentra en la parte terminal de los cromosomas. A menudo estos cromosomas presentan satélites en sus brazos cortos, así como un tallo compuesto de ARN ribosomal.

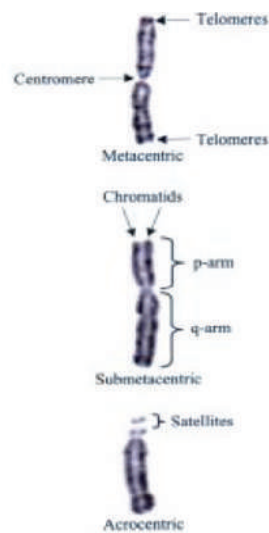


Figura N° 2. Anatomía cromosómica.

Las partes terminales (extremos) de todos los cromosomas se conocen como telómeros, y constan de secuencias repetitivas de TTAGGG.

En los cromosomas, la cromatina se encuentra como una larga y continua hebra, que posee la doble hélice de ADN. El ADN es empacado en cada uno de los cromosomas de forma eficiente, para permitir la transcripción genética, la regulación, la replicación, el apareo de los cromosomas homólogos, el entrecruzamiento y la segregación cromosómica.

NOMENCLATURA DE LA CITOGENÉTICA: VISUALIZACIÓN DE LOS CROMOSOMAS

El establecimiento y la estandarización de la nomenclatura, por medio del Sistema Internacional de Nomenclatura, conocido como ISCN por sus siglas en inglés (*International System Cytogenetic Nomenclature*) (creado en 1960 y actualizado en 1994 y 2013), ha permitido a los citogenetistas comunicarse sin la necesidad de contar con la imagen visual propia de los cromosomas (visualización de los cromosomas en un cariotipo).

De acuerdo con el ISCN, para la descripción del cariotipo, se nombra primero el número total de cromosomas, incluyendo los sexuales, seguido por una

coma y luego por la designación de los cromosomas sexuales; así, la nomenclatura para un varón sano es 46, XY (Figura N° 3) y de una mujer sana 46, XX.

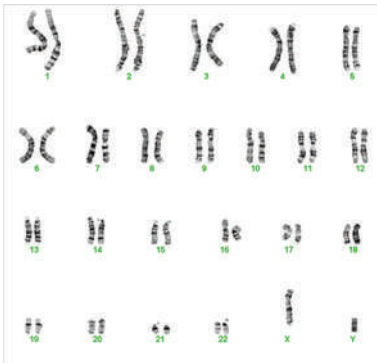


Figura N° 3. Cariotipo patrón normal en sangre periférica con bandeo G en paciente masculino: 46, XY.

Los autosomas se especifican solo si hay una anomalía cromosómica. Por ejemplo: 47, XY,+21; en este caso se está indicando varón con la presencia de un

extra cromosoma 21, compatible con la trisomía 21 (síndrome de Down). Otros ejemplos se presentan en la Cuadro N° 1.

Cuadro N° 1. Ejemplos de nomenclatura en la citogenética humana	
Nomenclatura	Interpretación
46, XY	Cariotipo normal masculino, 46 cromosomas 1 X y 1 Y
46, XX	Cariotipo normal femenino, 46 cromosomas 2 cromosomas X
45, X	45 cromosomas, 1 cromosoma X
47, XXY	47 cromosomas, 2 cromosomas X y un cromosoma Y
47, XY,+21	47 cromosomas, 1 X, 1 Y y cromosomas 21
mos 45,X/46,XX	Mosaico, algunas células tienen 45 cromosomas, incluyen 1 X, otras células con 46 cromosomas y 2 X
46,X,i(X)(q10)	Isocromosoma del brazo largo de un X
46,X,idic(X)(q28)	Isodicéntrico del X, punto de quiebre Xq28
46,XX,del(1)(q21)	Deleción del cromosoma 1; punto de quiebre 1q21
46,XY,r(2)(p21q31)	Anillo del cromosoma 2; punto de quiebre de 2p21 y 2q31
46,XX,t(9;22)(q34;q11.2)	Translocación entre el cromosoma 9 y 22, punto de quiebre 9q34 y 22q11.2

LAS ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS

Las anomalías cromosómicas en una persona pueden deberse a razones constitucionales o adquiridas. En el caso de las constitucionales, los errores cromosómicos se dan en el embrión, involucra todos los tejidos del individuo y causan defectos al nacimiento, infertilidad y otros problemas médicos; mientras que las adquiridas solo involucran a un órgano y la mayoría de

las desarrolladas después del nacimiento se asocian a procesos neoplásicos; por tanto, quien la presenta suele tener cáncer en el órgano afectado.

Por otra parte, las anomalías cromosómicas se clasifican como numéricas o estructurales. Las numéricas se subclasifican en poliploides o aneuploides (Figura N° 4).

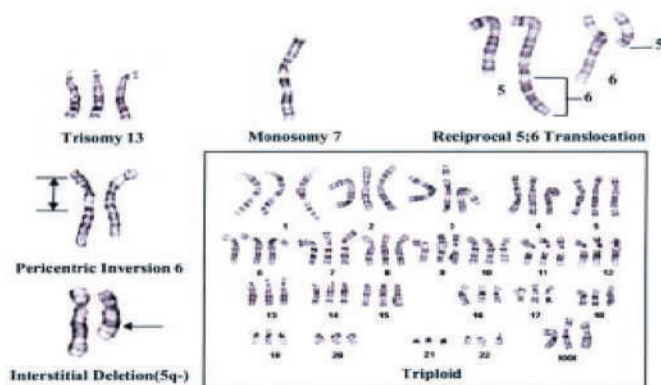


Figura N° 4. Anomalías cromosómicas numéricas y estructurales.

La ploidía se refiere al número de sets haploides de cromosomas. El gameto femenino (óvulo) y el gameto masculino (espermatozoide) poseen cada uno un set haploide de 23 cromosomas; mientras que las células somáticas son diploides, es decir, poseen 23 **pares** de cromosomas, para un total de 46 cromosomas.

La aneuploidía, también conocida como poliploidía, se refiere a una variación en el número cromosómico haploide, debido a un cromosoma extra o ausente. La adición de un cromosoma se conoce como trisomía, y la pérdida de un cromosoma como monosomía. Cuando la célula tiene un cromosoma más presenta un total de 47 cromosomas y cuando tiene uno menos presenta 45 cromosomas.

La aneuploidía usualmente ocurre como consecuencia de un error en la división mitótica, como lo es la no disyunción cromosómica. Ejemplo de esta anomalía son las trisomías y las triploidías (Figura N° 4), que refiere a 69 cromosomas, y la tetraploidía, referente a 92 cromosomas. La triploidía y la tetraploidía se han observado en embarazos molares y en fetos abortados de forma espontánea. Por lo general, la poliploidía está asociada con desórdenes neoplásicos, aunque el set de cromosomas no siempre es completo.

Con respecto a las alteraciones estructurales de los cromosomas, estas se dividen en translocaciones, deleciones, inversiones y duplicaciones o isocromo-

somas. Las translocaciones refieren al intercambio de partes de diferentes cromosomas; la deleción involucra la pérdida de una parte de un cromosoma, ya sea terminal o intersticial; la inversión provoca un reverso en la dirección de una parte intersticial de un cromosoma; y la duplicación produce dos o más copias de un segmento particular de ADN sobre el mismo cromosoma.

Estas alteraciones estructurales pueden ser generadas espontáneamente, donde el riesgo de recurrencia es mínima, o ser heredadas, donde los riesgos de recurrencia son de un 5% a un 50%, dependiendo también del tipo de anomalía y del cromosoma involucrado.

EL ANÁLISIS CITOGÉNÉTICO EN LA PRÁCTICA CLÍNICA

La citogenética se utiliza con bastante frecuencia en la práctica clínica; participa de manera importante en el establecimiento de los diagnósticos en malformaciones prenatales y postnatales, síndromes genéticos innatos, problemas en el desarrollo y diferenciación sexual y comportamiento a nivel postnatal, así como en la detección de alteraciones cromosómicas en las diferentes enfermedades oncohematológicas.

Su aplicación también es relevante en el consejo genético, en el diagnóstico de familias con riesgo de

heredar anormalidades cromosómicas, infertilidad y pérdidas gestacionales recurrentes.

Los estudios citogenéticos se realizan en diversas muestras como: líquidos amnióticos, cordocentesis, productos de pérdidas gestacionales, médula ósea, sangre periférica, tejidos en general, biopsias, tejidos parafinados, piel, entre otros.

En estudios de oncohematología, la citogenética desempeña un papel crucial en el diagnóstico, el pronóstico, la definición del tratamiento, el monitoreo de la remisión, la terapia y el monitoreo posterior a un trasplante de médula ósea.

Además, en la citogenética molecular, la técnica complementaria del **FISH** (*Fluorescence In Situ Hybridization*) puede ser ampliamente utilizada en los mismos estudios prenatales, congénitos y adquiridos; utilizando las mismas muestras analizadas en la citogenética convencional, proporcionando resultados confirmatorios específicos de alta sensibilidad y en tiempos más oportunos.

ANÁLISIS CITOGENÉTICO EN EL DIAGNÓSTICO DE DESÓRDENES HEMATOLÓGICOS

Las anormalidades cromosómicas no al azar (*Non-random*), son una característica común de muchos desórdenes hematolinfoides y un componente clave para explicar la patogénesis.

En la actualidad, las enfermedades hematológicas fueron reclasificadas de acuerdo a las técnicas morfológicas, el inmunofenotipo, la citogenética y los estudios moleculares, facilitando los diagnósticos. Además, esta nueva clasificación, junto con la localización de genes involucrados en el proceso maligno, ha permitido el desarrollo de "blancos terapéuticos" (*target therapy*).

Sin embargo, a pesar del continuo avance de las diferentes técnicas genéticas como el FISH y de técnicas moleculares como la PCR (cadena reacción polimerasa), los desórdenes hematológicos requieren el estudio de la totalidad del genoma de las células neoplásicas; es decir, es necesario realizar un cultivo de cromosomas para definir un cariotipo.

El cariotipo va a especificar si existen cambios numéricos y estructurales; para ello, se deben determinar los cambios cromosómicos que pueden cursar en estas enfermedades hematológicas, los cuales pueden ser primarios o secundarios:

1. Cambio cromosómico primario: es el proceso biológico ligado a la transformación maligna y está

estrechamente relacionado con los mecanismos moleculares, los cuales serían los responsables de las neoplasias. Este cambio es detectado por citogenética convencional, por fluorescencia *in situ* hibridización (FISH) y técnicas moleculares.

2. Cambio cromosómico secundario: su hallazgo indica que la enfermedad puede entrar en un curso más agresivo, por su resistencia a la quimioterapia, por lo que no harán remisión o será de muy corta duración. La mayor parte de estos cambios solo son detectados por citogenética convencional, debido a los rearrreglos complejos y al análisis que se realiza en todos los cromosomas.

De ahí que se recomienda siempre el análisis de los cromosomas al momento del diagnóstico.

Procedimientos técnicos del cultivo de médula ósea para análisis citogenético

El aspirado de médula ósea es el tejido idóneo para realizar el análisis cromosómico en pacientes con leucemias agudas, neoplasias mieloproliferativas, mielodisplasias y leucemia linfocítica crónica. En su mayoría, estas muestras contienen células normales y anormales, que se dividen espontáneamente y que continuarán su proceso mitótico al ser cultivadas *in vitro* en el laboratorio, por un corto período de tiempo (*short-term*) (de 24-48 horas), sin la necesidad de utilizar estimulantes de la división celular, como la fitohemaglutinina.

Preparación de una muestra de médula ósea para el estudio de citogenética

La muestra de médula ósea es una de las más difíciles de trabajar; tanto al momento del aspirado como en su manejo en el laboratorio, demandan una serie de habilidades y conocimientos por parte del médico hematólogo y del citogenetista. Su dificultad radica principalmente en que son muestras de escaso volumen, presentan bajo conteo celular, pueden coagularse y al analizarlas pueden coexistir células normales y anormales (además de que no se detecta si la alteración es menor a 10 Mb).

Se deben tomar todas las consideraciones posibles para obtener un adecuado cultivo de la muestra; por ejemplo: definir los tiempos de cultivos (directos 24-48 horas), los de cosecha (técnica de obtención de cromosomas), el montaje de las láminas con metafases apropiadas, el bandeo cromosómico y los análisis de 20 metafases de los posibles clones obtenidos en el cultivo, debidamente documentado.

Toma de muestra: médula ósea, ganglio infiltrado o aspirados de aguja fina o sangre periférica como sustituto de médula ósea

El médico hematólogo debe transferir en forma estéril 1-2 ml (menor cantidad es aceptable si es hipercelular) de médula ósea a un tubo que contiene el medio de transporte (medio especial nutritivo para cultivo de cromosomas de médula ósea), el cual debe ser trasladado pronto al Laboratorio de Citogenética, para mantener la viabilidad celular.

Es obligatorio indicar la información clínica, el diagnóstico de referencia y la historia del tratamiento. Además, se debe completar la Solicitud de Citogenética en Médula Ósea.

En pacientes con linfoma, la muestra de médula ósea no será muy concluyente, a menos que se evidencie que la médula esté infiltrada. Dicha muestra puede tener una baja tasa de división mitótica, no lográndose obtener cromosomas; sin embargo, cabe indicar que en la mayoría de los linfomas en niños y en las enfermedades de estado avanzado con infiltración en médula, la muestra contiene células leucémicas, por lo que se tendrán suficientes células para obtener un resultado con información importante. Para ello, lo ideal es recibir el ganglio infiltrado o aspirados de aguja fina en solución salina estéril, para poder realizar un cultivo adecuado.

El uso de sangre periférica, conocido como sustituto de médula ósea, en realidad no está recomendado para el estudio de las leucemias. El índice mitótico es extremadamente bajo cuando el porcentaje de blastos circulantes es menor al 30%. La morfología cromosómica de estas células que se dividen de forma espon-

tánea en la sangre periférica es de muy pobre morfología, haciendo difícil su análisis y su interpretación. Sin embargo, se debe considerar siempre el uso de sangre periférica (sustituto de médula ósea) cuando el acceso a la médula ósea es imposible.

El sustituto de médula ósea debe cumplir los siguientes criterios: conteo de células blancas superior a 10.000 uL y existe al menos un 10% de blastos circulantes. Esta muestra debe cultivarse sin fitohemaglutinina.

LA CITOGENÉTICA EN EL DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO DE LOS DESÓRDENES LINFOIDES

Leucemia/linfoma linfoblástico B con alteraciones cromosómicas recurrentes

La leucemia linfocítica aguda comprende células precursoras neoplásicas comprometidas a la línea B o T. El linaje B es más frecuente y acontece para el 85% de los niños con LLA y un 75% de adultos con LLA.

Las alteraciones cromosómicas para las LLA-T comprenden entre un 50% y un 70% de los casos. Las alteraciones numéricas son menos frecuentes que en la LLA B, con excepción del 5% que corresponde a la presencia de tetraploidías.

El Cuadro N° 2 muestra las alteraciones, los genes involucrados y el pronóstico en leucemia linfocítica B. Estas anomalías se pueden detectar en el cariotipo y ser confirmadas mediante la técnica de FISH.

En general, aproximadamente el 35% de los casos muestran rearrreglos del locus TCR en 7q34 (TCRB) o 14q11 (TCRA/D) (Cuadro N° 3).

Cuadro N° 2. Anormalidades cromosómicas más frecuentes reportadas en LLA-B común			
Alteración cromosómica	Genes	FISH	Pronóstico
t(12;21)(p13;q22)	ETV6-RUNX1	ETV6/RUNX1	favorable
t(9;22)(q34;q11.2)	BCR1-ABL1	BCR/ABL1	desfavorable
Rearreglos 11q23	MLL	MLL de separación	depende del cromosoma involucrado
t(4;11)(q21;q23)	AFF1/MLL		desfavorable
Rearreglos 14q32	IGH@	IGH de separación	desfavorable
t(X;14)(p22;q32)	IGH@/CRLF2	IGH de separación	desfavorable
Hiperdiploide		CEP X,4,10,17,18,21	favorable

Cuadro N° 2. Anormalidades cromosómicas más frecuentes reportadas en LLA-B común			
Alteración cromosómica	Genes	FISH	Pronóstico
Hipodiploide (menos de 44); mayoría de casos pérdidas del 3 y 7		CEP1,3,7,11,17	desfavorable
t(1;19)(q23;p13)	PBX1/TCF3	TCF3 de separación TCF3/PBX1	Intermedio
t(17;19)(q22;p13)	HLF/TCF3	TCF3 de separación	desfavorable
dic(9;20)(p11-13;q11)		CEP9 y 20	Intermedio
dic(9;12)(p13;p13)	PAX5/ETV6	PAX5 de separación	favorable
Amplificación 21	Incluye RUNX1	ETV6/RUNX1	Desfavorable pero depende protocolo
Anormalidades 9p21	P16	sonda CDKN2A	incierto
Anormalidades 7p12	IKZF1	Sonda IKZF1	desfavorable
t(8;14)(q24.1;q32.3)	IGH@/MYC	MYC de separación IGH/MYC	desfavorable
Cariotipo complejo más de 4 anormalidades			Desfavorable en adultos
Near triploides			Desfavorable en adultos

Cuadro N° 3. Alteraciones citogenéticas comunes en LLA- B y LLA-T	
Alteraciones citogenética en LLA-B	Alteraciones citogenética en LLA-T
•γ Línea B - Hiperdiploidía, hipodiploidía. - T(9;22). - dic(9;12);dic(9;20), alteraciones en 9p. - t(1;19). - t(12;21). - 21q22 (AML1) amplificación. - t(8;14),t(2;8),t(8;22). - MLL (11q23) rearrreglos. - Ganancia material en 1q, deleción 6q, 7p, 17p y otros.	•γ Línea T - TCR rearrreglos. - t(11;14)(p13;q11.2). - Tetraploidía. - TAL/SCL 1p32. - t(10;11) CALM/AF10. - t(5;14) HOX1-IL2. - t(10;11) t(710) HOX11. - MLL t(11;19). - Anormalidades en 9p i(9)(q10), deleción en 6q, 7p, 17p y otros.

Alteraciones numéricas en LLA

Cariotipo hipodiploide

- γ Usualmente < 30 cromosomas; típicamente entre 23 y 28.

- γ LLA B precursor (hallazgo poco frecuente).

- γ El paciente será agrupado en un pobre pronóstico con un corto período de remisión. Las pérdidas cromosómicas no ocurren al azar y se retienen los cromosomas 6, 8, 10, 14, 18, 21, X/Y (Figura N° 5).

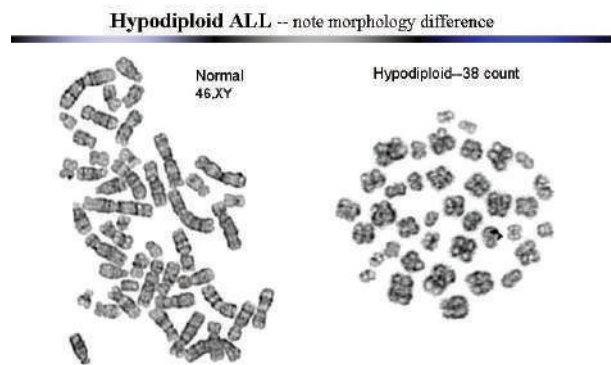


Figura N° 5. Ejemplos de mitosis diploide e hipodiploide.

Cariotipo hiperdiploide

- γ > 50-68 cromosomas.
- γ Común en niños (20-30% de LLA infantil). Se observa la ganancia de los cromosomas X, 4, 6, 10,

14, 18 y 21. Está asociado con un conteo bajo de leucocitos.

- γ El pronóstico es bueno, con supervivencia de 70-80%. Trisomía del cromosoma 4 y 10 se asocia con buen pronóstico, excepto la presencia de i(17q), que se asocia con mal pronóstico (Figura N° 6).



Figura N° 6. Cariotipo hiperdiploide. Se observan cromosomas extras.

Alteraciones cromosómicas estructurales más frecuentes en LLA-B

Las cuatro principales translocaciones que por el pronóstico y recurrencia se identifican más en la LLA-B son:

- γ t(12;21)(p13;q22): TEL/AML1(ETV6/RUNX1), presente en más del 25-30% de los casos de leucemia linfocítica aguda B (precursora); sin embargo, es rara en infantes y adultos. El hallazgo de esta translocación es críptica (solo demostrada por FISH). De buen pronóstico en la mayoría de los pacientes.
- γ t(9;22)(q34;q11.2): BCR/ABL, se encuentra en

2-5% de los niños y en más de 25% en adultos. El producto genético de esta fusión es una proteína de 190-KDa, que al igual que en la leucemia mieloide crónica (LMC), posee una actividad desregulada de tirosina quinasa, responsable de la transformación a la leucemia. El pronóstico es extremadamente pobre, en especial si existe la pérdida del cromosoma 7 (monosomía 7). Se recomienda el trasplante de médula ósea en estos pacientes.

- γ t(4;11), t(11;19) y t(9;11) rearreglos del gen MLL en el cromosoma 11q23, está presente en el 80% de leucemia del infante (menores de un año de edad) y en leucemias secundarias al tratamiento con inhi-

bidores de la topoisomerasa II. El inmunofenotipo corresponde a una línea pre-B o temprana y coexpresa antígenos mieloides, excepto el CD10. Por lo general, las LLA involucran rearrreglos con el gen MLL. Se considera una enfermedad clínicamente agresiva y con pobre pronóstico (Figura N° 7).

• $t(1;19)(q23;p13.3)$: E2A/PBX1(TCF3/PBX1), se halla en aproximadamente el 5% de adultos y niños. Codifica para una proteína de fusión E2A/PBX1. La aplicación de quimioterapia intensa ha permitido que estos pacientes tengan un mejor pronóstico cuando esta translocación de alto riesgo se encuentra presente.

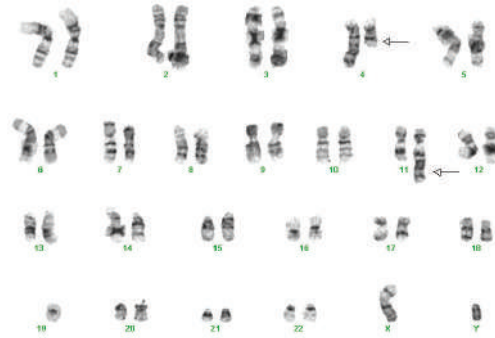


Figura N° 7. Cariotipo anormal en cromosomas de médula ósea con la presencia de la $t(4;11)(q21;q23)$.

LA CITOGENÉTICA EN EL DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO EN LOS DESÓRDENES MIELOIDES

Síndromes mielodisplásicos

Los análisis de citogenética pueden identificar anomalías en 40-70% de los casos de *novo* y en el 95% de aquellos casos secundarios a tratamiento.

Los cromosomas más relacionados a estos desórdenes son la pérdida del cromosoma 5 o 7, las deleciones del brazo largo de estos cromosomas, la trisomía 8 y la deleción del brazo largo del cromosoma 20 (20q). Otros rearrreglos estructurales menos frecuentes involucran al cromosoma 3q, deleción del cromosoma 11q, y 17p; se han observado casos con trisomía 9 y 21.

Estos hallazgos también se pueden ver en LMA (leucemia mieloide aguda). Los cariotipos complejos pueden indicar estados más avanzados de la enfermedad o la transformación a un proceso leucémico como a LMA. Por lo general, los que involucran al cromosoma 7 y los que tienen tres o más anomalías, son de peor pronóstico.

La pérdida del cromosoma Y se relaciona con la edad avanzada del paciente hematológicamente normal; sin embargo, con un diagnóstico de mielodisplasia se puede dar la ausencia del cromosoma Y, producto del evento hematológico.

El 30-60% de pacientes con SMD presentan cariotipos

normales en médula ósea, aunque hay un subgrupo de estos pacientes en los que se han detectado anomalías aplicando paneles de FISH para marcadores específicos de los cromosomas 5, 7, 8, 11 y 13.

Leucemia mieloide aguda

De acuerdo con el actual esquema de clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS), los siguientes subtipos de LMA (leucemia mieloide aguda) se caracterizan por recurrentes alteraciones cromosómicas asociadas a rearrreglos moleculares específicos, tal y como se detalla a continuación:

- $t(8;21)(q22;q22)$ -RUNX1/RUNX1T1: (clasificación FAB, LMA-M2). Esta translocación se presenta en aproximadamente el 30% de la LMA con maduración. Pueden observarse con otras alteraciones, como pérdida del cromosoma Y o deleción de 9q.
- $t(15;17)(q22;q12)$ -PML-RARa: leucemia promielocítica aguda (LPA)[LMA-M3]. El gen receptor alpha ácido retinoico (RARa) en 17q12 se fusiona con el gen PML del 15q22, produciendo el gen de fusión PML/Rar. Se puede detectar en el cariotipo en cultivo de cromosoma por 24 horas o por FISH con sonda de fusión y/o *break apart* del 17q12, para detectar translocaciones variantes asociadas a LPA que involucran el gen RARa. Estos pacientes con la $t(15;17)$ son sensibles al tratamiento de ácido transretinoico específico e importante para su remisión (Figura N° 8).

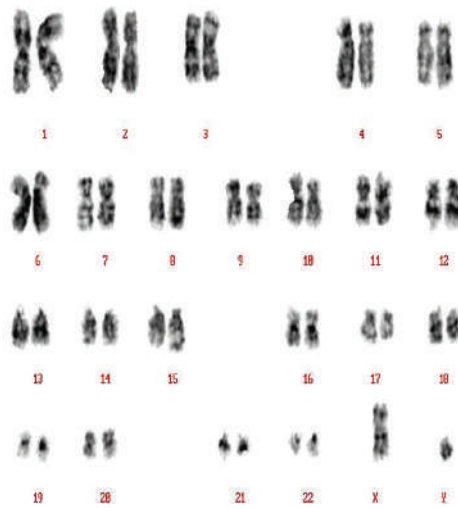


Figura N° 8. Cariotipo anormal en LPA con la presencia de la $t(15;17)(q22;q12)$.

- γ **inv (16), t(16;16)- CBFB/MYH11:** leucemia mielo-monocítica aguda (LMMA)[LMA-M4]. Se halla en el 10-12% de la LMA. Se produce al fusionarse el gen CBFB de 16q22 y el gen MYH11 de 16p13. Esta anomalía se puede detectar por FISH, usando una sonda CBFB *break apart*. Se puede observar trisomía 22. Estos pacientes se asocian a un aumento de la línea monocítica con componente anormal de la presencia de eosinófilos en médula ósea.
- γ **t(9;11)(p22;q23)- MLLT3/MLL:** LMA con rearrreglos para el cromosoma 11q23 asociado a línea mieloi-de monocítica. Se puede presentar en 5-6% de los casos a cualquier edad, aunque es más frecuente en niños. Las translocaciones más reportadas son $t(9;11)$ y $t(11;19)$. El gen MLL es muy promiscuo, ya que se le relaciona con más de 73 translocaciones recurrentes, por lo que la técnica de detección establecida es FISH con la sonda 11q23 MLL *break*

apart. Rearreglos de este gen y el cromosoma 7 en este tipo de LMA se clasifican en grupos de pobre pronóstico.

- γ **inv(3)(q21q26.2) o t(3;3)(q21;q26.2)-RPN1/EVI1:** el paciente presenta un aumento de megacariocitos en médula ósea asociado a displasia.
- γ **t(1;22)(p13;q13) - RBM15/MKL1:** menos de 1% de los casos que presentan morfología atípica en los megacarioblastos. Generalmente, se observan en casos *de novo* en LMA en niños.

Además de las mencionadas, se reportan muchas más alteraciones citogenéticas relacionadas con la LMA.

En el Cuadro N° 4 se muestran los rearrreglos de mayor frecuencia reportados en este tipo de leucemia y su clasificación por grupo de riesgo.

Cuadro N° 4. Grupo de riesgo por hallazgo citogenético en leucemia mieloide aguda		
Grupo de riesgo	Citogenética	Genes
Favorable	$t(8;21)(q22;q22)$ LMA-M2 $t(15;17)(q22;q21)$ LMA-M3 LPA Inv16 (p13;q22) o $t(16;16)$ LMA-M4 Cariotipo normal	RUNX1-RUNX1T1 PML-RARa (LPA) CBF-BetaMYH11NPM1 o CEBPA mutación, con FLT3-ITD normales
Intermedio	Cariotipo normal $t(9;11)$ Otros cambios cromosómicos no definidos Trisomía 8	MLLT3-MLL

Cuadro N° 4. Grupo de riesgo por hallazgo citogenético en leucemia mieloide aguda		
Grupo de riesgo	Citogenética	Genes
Desfavorable	Deleción del cromosoma 5 y 7 t(6;9) inv(3) o t(3;3) Variable;11q23 translocaciones Monosomía 5, del5q, monosomía 7 3 o más cambios cromosómicos sin la presencia de translocaciones o las inversiones recurrentes. Cariotipo normal	DEK-NUP214 RPN1-EV1I Rearreglos MLL FLT3-ITD con o sin mutaciones de NPM1 o sobreexpresión de ERG y BAALC.

CITOGÉNÉTICA EN LOS DESÓRDENES NEOPLÁSICOS MIELOPROLIFERATIVOS (DNMP)

La mayoría de los DNMP no se caracterizan por la presencia de una única anormalidad citogenética, sino mas bien por presentar diferentes mutaciones en los genes que codifican para las tirosina quinasa citoplasmática o de receptores. Tales mutaciones, como el JAK2 V617F y FIPL1-PDGFRA, son genes de fusión que afectan la proliferación celular en lugar de la diferenciación. Por lo general, los DNMP involucran alteraciones en los cromosomas 1, 8, 9,13 y 20.

Leucemia mieloide crónica, BCR/ABL positivo

La leucemia mieloide crónica (LMC), BCR/ABL positiva, es el primer proceso hematológico en ser asociado a una anormalidad cromosómica específica: la t(9;22) (q34;q11.2), que origina el cromosoma Philadelphia (Ph+), el cual se visualiza en el cariotipo (Figura N° 9).

Las variantes de translocaciones complejas que involucran la presencia del cromosoma Philadelphia, se encuentran en un 10% de los casos. Este fenómeno es diferente a los cambios cromosómicos que se presentan en la evolución clonal, como se detalla más adelante.

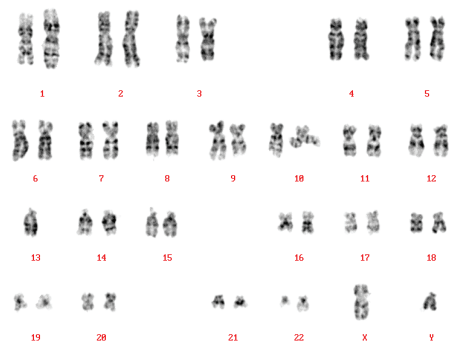


Figura N° 9. Cariotipo mostrando la presencia de la translocación entre los brazos largos de los cromosomas 9 y 22. LMC Philadelphia positivo (Ph+).

La LMC es definida por la presencia del cromosoma Philadelphia, y resulta de la translocación recíproca del material genético entre los brazos largos de los cromosomas 9 (gen ABL) y 22 (gen BCR). El resultado es una oncoproteína con actividad tirosina quinasa, que altera las diferentes vías de la transducción de señales de la célula, generando una descontrolada proliferación celular y una reducida apoptosis.

Los tratamientos efectivos para la LMC, tales como imatinib mesylate (GLEEVEC), alfa-interferón y el tras-

plante alógeno de médula ósea, representan la solución para disminuir la presencia del cromosoma Ph+ en médula ósea, resultando en un biomarcador citogenético importante en el monitoreo de la enfermedad.

Los criterios utilizados para evaluar el tratamiento con imatinib mesylate u otros inhibidores de la tirosina quinasa (nilotinib, dasatinib), se basan en la respuesta hematológica, citogenética y molecular del paciente. En el Cuadro N° 5 se establecen esos criterios fundamentados en los resultados de la citogenética, la que debe ser valorada cada tres meses.

Cuadro N° 5. Respuesta citogenética (RCy) en el monitoreo de la LMC en tratamiento con los inhibidores de la tirosina quinasa	
Respuesta citogenética RCy cada tres meses	Definición
Rcy Mayor completa	0% metafases Ph+ (MO)
Rcy Mayor parcial	1%-35% metafases Ph+ (MO)
RcyMenor	36%-95% metafases Ph+ (MO)

De las tres modalidades de diagnóstico (cariotipo, FISH, RT-PCR) solamente el cariotipo proveerá la información total del genoma, permitiendo la identificación de la evolución clonal a un proceso agudo, cuando se detectan alteraciones cromosómicas (ACAs) en las células en división de la médula ósea, tales como trisomía 8, isocromosoma 17, trisomía 19 y copias adicionales del cromosoma Ph+ (derivativo cromosoma 22); esto confirmaría la transformación a una fase acelerada o fase blástica, lo cual es urgente conocer para realizar un cambio en la estrategia de tratamientos.

La mayoría de los pacientes responden a la terapia con imatinib. Alrededor de un 20-25% llegan a presentar resistencia; para identificar a este grupo de pacientes es fundamental el adecuado monitoreo citogenético temprano.

Policitemia vera (PV)

Los marcadores citogenéticos más importantes en PV, en orden de frecuencia, son: delección del brazo largo del cromosoma 20 (20q), presencia de un extra cromosoma 8 (+8), un extra cromosoma 9 (+9) y rearrreglos del brazo corto del cromosoma 9 (9p), ganancia de 1q y delección del brazo largo del cromosoma 13, del (13q). Estas anormalidades se hallan en un 15-25% de los casos. La trisomía 8 puede encontrarse como única anormalidad o puede estar junto con la trisomía 9. La presencia de estos cromosomas puede persistir por largo período de tiempo sin presentarse evolución clonal o transformación a un proceso agudo; sin embargo, si se presentan cambios adicionales cromosómicos, estos serían predictivos de un mal pronóstico, exceptuando la del (20q) y del (13q).

La delección del brazo largo del cromosoma 20 sugiere la delección o inactivación de genes que participan en la regulación de los progenitores hematopoyéticos; su presencia al momento del diagnóstico y como única anormalidad cromosómica, es esencial en la patogénesis temprana de la enfermedad.

Trombocitopenia esencial (TE)

Menos del 10% presentan anormalidades citogenéticas y no son específicas de este desorden. Se pueden observar delecciones en 5q, 13q y 20q, junto con +8, +9 y la ganancia de 1q. El hallazgo que sí tiene impacto en el pronóstico es la presencia de alteraciones cromosómicas en el cromosoma 7 y 17, lo cual indica un alto riesgo a transformación leucémica. El que no exista una alteración cromosómica específica para este desorden y el que no se observe el cromosoma Philadelphia, se convierte en un diagnóstico diferencial como causa de la trombocitosis.

Mielofibrosis primaria (MFP)

Se encuentran alteraciones cromosómicas en un 40-50% de los casos y en su mayoría son casos en transformación. La presencia ya sea del (13)(q12-22) o der(6)t(1;6)(q21-23;p21.3) sugiere fuertemente su diagnóstico, aunque no es exclusivo de MFP. Alteraciones cromosómicas no al azar son similares a las encontradas en PV, incluyendo las trisomías del cromosoma 8, 9 y 21, así como del (13q) y del (20q). Si la enfermedad progresa se observan cambios estructurales adicionales, como ganancia de 1q, alteraciones en el cromosoma 7q y del (17p). La importancia de encontrar alteraciones en 7q al igual que en 5q, permite administrar terapias citotóxicas que son utilizadas en los tratamientos de los pacientes con desórdenes mieloproliferativos.

Leucemia neutrofílica crónica

Un alto porcentaje de estos pacientes muestran cariotipo normal; sin embargo, pueden acompañarse por +8, +9, +21, del (11q), del (12p) y del (20q).

Leucemia eosinofílica crónica/síndrome hipereosinofílico idiopático (CEL/HES)

Pertenece al subgrupo OMS de las neoplasias mieloide y linfóide con rearrreglos en PDGFRA. Estos desórdenes

se caracterizan por la persistencia inexplicable de eosinofilia y rearrreglos del gen PDGFRAS; estos últimos provocan la formación de una proteína híbrida de fusión con actividad tirosina quinasa, por lo que los pacientes con CEL pueden verse beneficiados con el tratamiento de imatinib mesylate (GLEEVEC) cuando se fusiona específicamente FIP1L1/PDGFRA, que corresponde a la translocación t(1;4)(q44;q12).

Citogenética molecular

Utilidad del FISH (*fluorescence in situ hybridization*) en el análisis de muestras de médula ósea y sangre periférica en neoplasias hematológicas

Los análisis de citogenética de médula ósea o cultivos de sangre periférica permiten detectar las diferentes anomalías cromosómicas involucradas en las neoplasias hematológicas; no obstante, se presentan situaciones técnicas en el laboratorio que dificultan su detección, como por ejemplo: bajo índice mitótico, pobre morfología cromosómica, alta complejidad del cariotipo y cariotipos normales que obstaculizan el proceso para concluir los casos satisfactoriamente, lo que hace necesario aplicar técnicas moleculares mediante las cuales se utilicen secuencias de ADN específicas y altamente sensibles para resolver estos problemas.

El FISH es una técnica complementaria en citogenética, de uso diagnóstico, altamente sensible, simple y rápida, que logra detectar rearrreglos específicos utilizando regiones genómicas de interés, ya sea en células en división o no, así como preparaciones directas de tejidos parafinados, identificando cambios citogenéticos en líneas celulares específicas.

Se utilizan sondas de ADN marcado con fluorescencia, generalmente comerciales, las cuales junto con la muestra a analizar se tratan con calor en una solución desnaturalizante de formamida que abre la hebra de ADN doble banda, seguido de un proceso de hibridación por 20 horas a 37 °C. En este lapso se hibridiza la banda de ADN de la sonda comercial a las hebras complementarias de ADN de la muestra blanco. Luego se realiza al análisis de las láminas procesadas en un microscopio equipado con los filtros apropiados para poder visualizar una correcta luz de fluorescencia, de acuerdo con los diferentes patrones de fluorocromos empleados. Se hace un conteo de señales brillantes, que suelen ser visualizadas en el espectro naranja y verde, según el tipo de sonda y rearrreglos específicos a determinar (Figura N° 10).

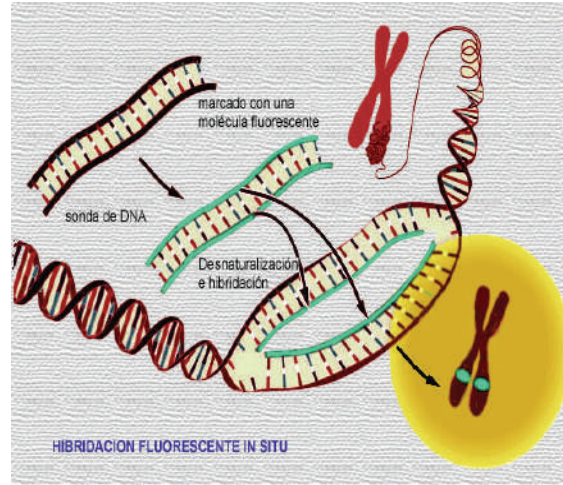


Figura N° 10. Ilustración representativa del fundamento de la técnica de FISH.

Se pueden usar distintas sondas y fluorocromos, así como tipos de muestras, ya sea para detectar una o más alteraciones en una región genómica específica. Se puede realizar en metafases o células en interfase. El FISH en interfase en el análisis de muestras hematológicas es ampliamente utilizado, debido a que se puede efectuar de manera directa en los blastos de médula ósea, ganglios linfáticos y preparaciones de tejidos parafinados.

Existen tres tipos de sondas disponibles en el mercado para realizar los análisis de FISH con finalidad clínica hematológica:

- 1- Sondas de enumeración centroméricas (CEPs). Estas son utilizadas con frecuencia para detectar la numeración cromosómica en los clones leucémicos; importante en ploidías o aneuploidías.

2- Locus específico (LSI). Este tipo de sonda hibridiza una región o un gen específico. Son útiles para identificar translocaciones recíprocas, inversiones cromosómicas, deleciones y amplificación de los genes. En metafases estas sondas se visualizan como señales brillantes en las regiones en estudio. En una deleción se observa la ausencia para una señal de algunos de los pares de cromosomas y la ganancia de señales es compatible con la amplificación de los genes en estudio. Las sondas LSI doble color se diseñan para poder detectar la unión de dos genes o regiones cromosómicas que originan una translocación recíproca. Las sondas LSI doble color “*break apart*”, son capaces de detectar rearrreglos en translocaciones que involucran uno o dos genes específicos; son segmentos de ADN que unen secuencias con puntos que van de 5' a 3', en el cual se ubican los genes en estudio, y son útiles

para detectar rearrreglos cuando hay una separación de este segmento al unirse a otro segmento cromosómico, evidenciando una translocación cromosómica, como por ejemplo la sonda para el gen MLL en el cromosoma 11q23, en el diagnóstico de rearrreglos en LMA M5 b.

3- Sondas de pintado completo cromosómico. Solo pueden utilizarse en metafase y sirven para detectar alteraciones numéricas y estructurales difíciles de identificar con la citogenética convencional, en ocasiones por la mala calidad de los cromosomas.

El Cuadro N° 6 presenta un resumen de las diferentes sondas de ADN disponibles en el comercio, comúnmente utilizadas en el diagnóstico de desórdenes hematológicos.

Cuadro N° 6. Sondas de ADN comerciales disponibles para análisis de FISH comúnmente utilizadas en neoplasias hematológicas			
Enfermedad	Anormalidad cromosómica	Genes involucrados	Sonda FISH
Leucemia mieloide crónica (LMC)	t(9; 22)(q34;q11.2)	BCR-ABL	Fusión BCR-ABL
Leucemia mieloide aguda (LMA)	t(8;21)(q22;q22)	RUNX1T1(ETO), RUNX1	Fusión RUNX1T1, RUNX1
	inv(16) (p13q22)	MYH11,CBFB	CBFB break apart
	t(v;11)(v;q23), del11q23	MLL	MLL break apart
	Monosomía 5/del 5q33-34	CSF1R	LSI CSF1R
	Monosomía 5/del 5q31	EGR1	LSI EGR1
	Monosomía 7/del 7q		D7S522/CEP7
	del 20q		D20S108
	Trisomía 8		CEP 8
LMA-M3	t(15;17)(q22;q12)	PML,RARA	Fusión PML-RARA
	t(v;17)(v;q12)	RARA	RARA break apart
Síndrome mielodisplásico (SMD)	Monosomía 5/del 5q33-34	CSF1R	LSI CSF1R
	Monosomía 5/del 5q31	EGR1	LSI EGR1
	Monosomía 7/del 7q		D7S522/CEP7
	del 20q		D20S108
	Trisomía 8		CEP 8
	del (11)(q23)	MLL	MLL break apart
	del (13)(q14)	RB1	LSI RB1

Cuadro N° 6. Sondas de ADN comerciales disponibles para análisis de FISH comúnmente utilizadas en neoplasias hematológicas			
Enfermedad	Anormalidad cromosómica	Genes involucrados	Sonda FISH
Neoplasmas mieloproliferativos (NMP)	Trisomía 8		CEP 8
	Trisomía 9		CEP 9
	del(4)(q12q12)	CHIC2	LSI CHIC2/q4ter
	PDGFRA/FIP1L1		fusión PDGFRA/FIP1L1
Leucemia linfocítica aguda B (LLA-B)	Trisomía 4, 10, 17		CEP 4, 10, 17
	t(12;21)(p13;q22)	ETV6(TEL),RUNX1(AML1)	Fusión TEL/AML
	t(v;11)(v;q23)	MLL	MLL break apart
	t(9;22)(q34;q11.2)	ABL,BCR	Fusión BCR/ABL
	t(1;19),t(17;19)	TCF3,PBX1	Fusión TCF3/PBX1
Leucemia linfocítica aguda T (LLA-T)	t(5;14)(q35;q32)	TLX3 (HOX11L2)	TLX3 break apart
	del(9)(p21)	p16	LSI p16
	7q35 TCR	beta TCR	Betas break apart
	7p14-15	TCgamma	TCR gammas break apart
	14q11.2	TCR alpha/Delta	TCR alpha/Delta
Leucemia linfocítica crónica (LLC)	del(11)(q22.3)	ATM	LSI ATM
	Trisomía 12		CEP 12
	del(13)(q14.3)		13q14
Mieloma múltiple (MM)	Monosomía 13/del 13q	RB1/LAMP1	LSI RB1/LAMP1
	Trisomía 5, 9, 15, 19		CEP 5, 9, 15, 19
	del(17)(p13)	TP53	TP 53
	t(11;14)(q13;q32)	CCDN1, IGH	Fusión CCDN1,IGH
	t(4;14)(p16.3;q32)	FGFR3, IGH	Fusión FGFR3, IGH
	t(14;16)(q32;q23)	IGH, MAF	Fusión IGH, MAF
	t(V;8)(V;q24)	MYH	MYH break apart
	t(V;14)(V;q32)	IGH	IGH break apart
Linfoma de manto (LM)	t(11;14)(q13;q32)	CCND1, IGH	Fusión CCND1, IGH
Linfoma folicular (LF)	t(14;18)(q13;q32)	IGH,Bcl2	Fusión IGH,Bcl2
Linfoma de Burkitt (LB)	t(8;14)(q24;q32)	MYC, IGH	Fusión MYC, IGH
	t(2;8)(p12;q24)	MYC, IGK	MYC break apart
	t(8;22)(q24;q11.1)	MYC, IGL	MYC break apart
Linfoma difuso B células grandes (LDCBG)	t(3;14)(q27;q32)	Bcl6,IGH	Bcl6 break apart
	t(2;3)(p12;q27)	IGK,Bcl6	Bcl6 break apart
	t(3;22)(q27;q11.2)	Bcl6, IGL	Bcl6 break apart

Cuadro N° 6. Sondas de ADN comerciales disponibles para análisis de FISH comúnmente utilizadas en neoplasias hematológicas			
Enfermedad	Anormalidad cromosómica	Genes involucrados	Sonda FISH
Linfoma células B asociado a tejido linfoide en mucosa (MALT)	t(11;18)(q21;q21)	API2, MALT	Fusión API2/MALT
	t(14;18)(q32;q21)	IGH, MALT	MALT break apart
Linfoma anaplásico (LAL)	t(2;5)(p23;q35)	ALK, NPM	ALK break apart

Las indicaciones más comunes para análisis de FISH en malignidades hematológicas son:

1. Confirmación de alguna anomalía cromosómica detectada en el análisis del cariotipo convencional.
2. Detección de un rearrreglo cromosómico cuando la clínica sugiere una anomalía específica.
3. Caracterización de rearrreglos específicos, usando paneles de sondas para enfermedad específica, que determinan el pronóstico y el manejo terapéutico.
4. La detección de translocaciones crípticas o enmascaradas, como la t(12;21) en LLA o t(4;14) en mieloma.
5. Detección de rearrreglos génicos asociados en linfomas en tejidos paraafinados.
6. Indicación para determinar el porcentaje de células positivas/negativas en muestras sugestivas de remisión o recaída.
7. Detección de quimerismos, como el monitoreo de pacientes postrasplantados de médula ósea.
8. Para la rápida detección de fusiones de genes que confirman translocaciones características de una leucemia específica importante para su pronto tratamiento, como PML/RARA en leucemia promielocítica aguda.

Utilidad de la aplicación de paneles de FISH para detección de rearrreglos moleculares en malignidades hematológicas

El FISH como herramienta complementaria en los estudios citogenéticos, es ampliamente utilizado para detectar las anomalías genéticas relacionadas con la mayoría de las neoplasias. Esta caracterización molecular permite explicar el proceso leucémico, el pronóstico e incluso el tratamiento de las personas con estas afecciones. El FISH también se utiliza como una herramienta rápida de monitoreo en los pacientes que ya poseen un abordaje terapéutico.

La disponibilidad comercial de las sondas ha revolucionado la utilización de esta técnica en los diferentes laboratorios de diagnóstico; a la vez, esto ha permitido estandarizar diferentes paneles de detección para la mayor parte de las enfermedades hematológicas antes mencionadas. La aplicación de los paneles permite identificar rápidamente la alteración crítica, clasificando al paciente en un grupo de riesgo determinado según su clínica, obteniendo una buena información genética de las neoplasias en estudio y contribuyendo a ampliar la epidemiología de las leucemias y linfomas en una población afectada por este tipo de cáncer.

Los paneles se pueden utilizar por grupo de enfermedades hematológicas. A continuación se describen los que más se usan, de acuerdo al diagnóstico.

•γ Panel LLA (leucemia linfocítica aguda).

Entre las sondas para definir pronóstico para LLA pediátrica destacan:

- BCR-ABL: t(9;22)(q34;q11.2) presencia del cromosoma Philadelphia.
- ETV6-RUNX1: t(12;21)(p13;q22).
- Rearreglos gen MLL cromosomas 11q23: t(4;11)(q21;q23).
- TCF3-PBX1: t(1;19)(q23;p13), t(17;19)(q22;p13).
- Ploidía cromosómica.

El FISH y/o RT-PCR se pueden realizar simultáneamente. La frecuencia de las principales anomalías varía según la edad; rearrreglos para MLL son más comunes en niños (menores de un año de edad); la t(12;21) es más común en casos pediátricos (edad 1-24 años), mientras que la t(9;22) es más común en casos de adultos (> 25 años) (Figura N° 11).

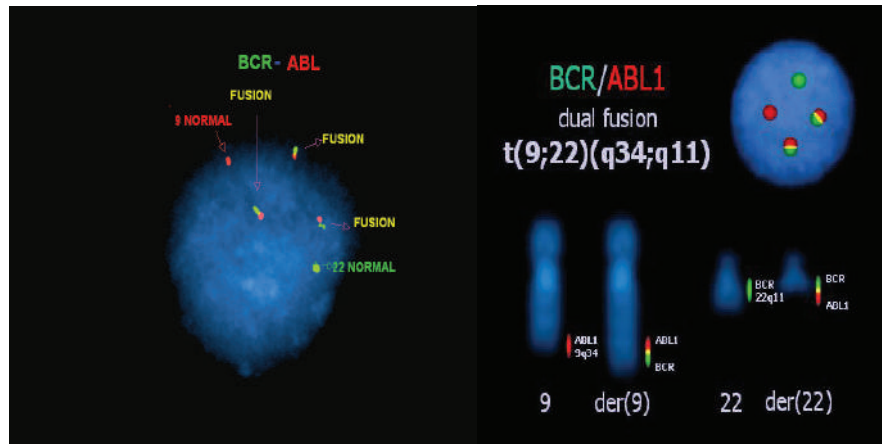


Figura N° 11. FISH en interfase de la fusión BCR-ABL, para la t(9;22)(q34;q11.2).

El FISH para detectar la fusión ETV6/RUNX1 es relevante en casos pediátricos, ya que la translocación es críptica citogenéticamente. Este FISH permite detectar amplificación del AML1 (RUNX1) y extraseñales para este gen sugestivo de cariotipos hiperploides.

En caso de que el cariotipo no se pueda realizar por pobre crecimiento cromosómico, pero sugiere ploidía cromosómica, se aplican sondas que detecten diferentes cromosomas relacionados a la alta hiperdiploidía, tales como los cromosomas X, 4, 10, 14, 17 y 18.

La t(4;11)(q21;q23) se asocia con pobre pronóstico; los pacientes con esta anomalía son tratados con protocolos de alto riesgo.

La t(1;19) y la t(17;19) se pueden detectar con sondas de "split" cromosómico o TCF3 "break apart". Estos pacientes se agrupan en pronóstico adverso.

•γ Panel LMA: leucemia mieloide aguda.

Gran cantidad de rearrreglos estructurales y numéricos están presentes en LMA; entre los más comunes se encuentran: monosomía y o delección de 5/5q, monosomía o delección de 7/7q, translocaciones que involucran el 11q23 con múltiples patrones, t(6;9), delecciones de 11q y 20q, rearrreglos con 3q36, trisomías de los cromosomas 8, 9, 11, 13, 19, 21 y 22.

Los paneles de sondas de FISH utilizadas para el análisis de pacientes con LMA son:

- EGR1 y CSI1FR: 5q31 monosomía 5/5q.
- CEP7/D7S486: 7q31 o monosomía 7.
- CEP 8: para detectar ganancia del cromosoma 8, trisomía 8.
- ETO/AML1 (RUNX1T1/RUNX1, 8q22/21q22 para

detectar la t(8;21).

- RARA en 17q21 para detectar la t(15;17)(PML/RARA).
- CBFβ en 16q22 para detectar la inv(16).
- MLL para detectar rearrreglos del gen MLL en 11q23.

•γ Panel SMD: síndromes mielodisplásicos.

Los síndromes mielodisplásicos constituyen un grupo de enfermedades hematológicas clínicamente muy heterogéneo. El análisis de citogenética es aceptado como un factor pronóstico significativo y un marcador como progresión a LMA.

El panel que ayuda evaluar esta etiología sirve para detectar anomalías sobre todo en el cromosoma 5 (EGR1 en 5q31 y CSF1R en 5q33-34); el cromosoma 7 (D7S486 en 7q31 y CEP 7); el cromosoma 8 (CEP8) y el cromosoma 20 (D20S108 en 20q12); así como alteraciones en el cromosoma 11q23 y el gen RB1 en el cromosoma 13q14.

La utilidad primaria del análisis del FISH en SMD es que alrededor de un 15-20% de los análisis de citogenética muestran un cariotipo normal, pero al aplicar el panel se puede detectar algún marcador clonal en bajo porcentaje que demuestre un cambio hematológico relevante, ya sea evidenciado por un aumento de blastos o de que se trate de una leucemia en transformación, siendo esto de peor pronóstico.

•γ Panel LLC: leucemia linfocítica crónica.

Por lo general, se aplica FISH en esta leucemia a las muestras que presentan baja proliferación del cultivo celular, por lo que es fundamental detectar rearrreglos que involucran ciertos genes. Las sondas más utilizadas son:

- MYB en 6q23.
- ATM en 11q22.3.
- D13S319 en 13q14.3.
- LAMP1 en 13q34.
- p53 en 17p13.1.
- CEP 12 trisomía 12.

En FISH se pueden detectar alteraciones genéticas en más del 80% de los casos. Las alteraciones más frecuentes son: la delección de 13q14 (55-65%), la delección de 17p13/p53 (7-8%) y la delección de 6q (5-6%). Esta identificación provee una importante identificación genética con valor pronóstico. La delección del cromosoma 13q como único evento o un cariotipo normal, predice un mejor pronóstico; mientras que la del (6q), del (11q) y del (17p) lo caracteriza de mal pronóstico. La trisomía 12 lo ubica también en un grupo de alto riesgo.

•γ Panel mieloma múltiple.

Este grupo de pacientes generalmente presentan cultivos de bajo índice mitótico y pobre calidad de la morfología de las metafases en los cariotipos, por lo que es imprescindible realizar FISH con un panel de sondas que detecten la mayoría de alteraciones genéticas relacionadas con esta etiología. Las sondas disponibles son:

- t(4;14) sondas FGFR3, IGH.
- t(11;14) sondas CCND1, IGH.
- t(14;16) sondas IGH, MAF.
- Delección 17p13 sondas p53 y.
- Monosomía 13/13q14.

La identificación de la monosomía 13/ del 13q por FISH es la anormalidad más detectada en MM. Dicha alteración se asocia a corta sobrevida y baja respuesta al tratamiento, y sugiere que puede encontrarse con otras anormalidades de mal pronóstico, como son los rearrreglos con IGH. La t(4;14) y la (14;16) son crípticas y están asociadas con hipodiploidía y sobrevida corta, así como a características clínicas agresivas.

La t(11;14) es la translocación más común observada en MM asociado; en general, se pueden visualizar bien los cariotipos, pero aplicar la sonda evidencia metafases con rearrreglos complejos. Esta se asocia al gen de la ciclina y tiene un pronóstico favorable.

•γ Panel linfomas: linfoma no Hodgkin.

La mayoría de los linfomas no Hodgkin demuestran anormalidades cromosómicas clonales. En este tipo de linfomas los cambios genéticos moleculares se asocian más a rearrreglos de oncogenes y a la yuxta-

posición de estos con el gen regulador de la secuencia de las inmunoglobulinas. Se evidencian ciertas translocaciones que van estar relacionadas con linfomas B o T, que incluso pueden subclasificar a un subtipo de linfoma.

No siempre se puede realizar análisis de citogenética en linfomas, por la calidad y esterilidad de la muestra; por esta razón, el FISH representa una herramienta versátil en la identificación de rearrreglos moleculares, por cuanto se dispone de una serie de sondas que se pueden aplicar directamente a tejidos parafinados en donde ya se ha identificado un linfoma específico y un área tumoral.

Entre los paneles comercialmente disponibles según el subtipo y la alteración genética están:

- **Linfoma folicular (LF):** la más frecuente es la t(14;18)(q32,q21), que detecta la yuxtaposición del protooncogen Bcl2 y el locus IGH en 14q32. Se identifica en 80-90% de LF. El gen Bcl2 translocado codifica para una proteína aberrante que inhibe la apoptosis.

El otro rearrreglo que se ha identificado en LF es del gen Bcl6 en 3q27, que incluso se evidencia en otros tipos de linfomas, como el linfoma difuso B de células grandes (LDCBG).

- **Linfoma Burkitt:** el protooncogen más asociado a este linfoma es el C-MYC en 8q24. Las translocaciones relacionadas son: t(8;14)(q24;q32), t(2;8)(p12;q24) y t(8;22)(q24;q11). La t(8;14) se observa en un 75-85% de los casos y el resto presentan las variantes anteriores. La yuxtaposición del gen MYC junto al gen IGH en 14q32, Ig kappa de 2p12 o Ig lambda en 22q11, inhibe la regulación en la sobreexpresión, produciendo una transformación maligna y dando origen a este tipo de linfoma.
- **Linfoma de manto:** la t(11;14)(q13,q32) es la más común reportada en este tipo de linfoma. Se identifica en 20% de los casos, en los cuales se observan rearrreglos complejos. El gen que se involucra es el CCND1, que se une al promotor del gen IGH en 14q32.

Otras sondas para detección son:

- **Tipo MALT (linfoma células B asociado a mucosa):** se aplica sonda *break apart* del cromosoma 18q21, que detecta la t(11;18) y la t(14;18).
- La translocación del gen ALK (**linfoma anaplásico kinasa**) del cromosoma 2p23, y el NPM del cromosoma 22p11.

soma 5q35, es la más común detectada en linfoma anaplásico de células grandes (LACG). La t(2;5) produce la formación de una proteína quimérica con actividad tirosina quinasa constitucional.

LA CITOGENÉTICA EN EL ESTUDIO DE LA ANEMIA DE FANCONI (AF)

Definición

La anemia de Fanconi es una enfermedad autosómica recesiva, que generalmente presenta fallo en la médula ósea, leucemia y carcinoma de células escamosas.

El diagnóstico temprano de AF permite la exclusión de otras enfermedades y establecer el manejo clínico. Se recomienda el consejo genético, debido al 25% de riesgo de AF en los subsecuentes embarazos.

Hallazgos hematológicos en AF

Pacientes con AF puede presentar anemia aplásica, SMD y LMA o citopenias simples sin explicación alguna (como las inmunológicas) o macrocitosis sin otra explicación (como deficiencia de folatos y vitamina B₁₂).

Se debe considerar AF en todos los niños y adultos jóvenes con citopenias sin explicación alguna.

Estudio citogenético recomendado: inducción de quebraduras cromosómicas

Cualquier sospecha clínica de AF debe ser referido por un Hematólogo y/o Genetista al Laboratorio de Citogenética, para efectuar el estudio de quebraduras cromosómicas, que es el examen clásico para establecer el diagnóstico.

La sangre periférica heparinizada se cultiva en un medio con agentes clastogénicos (*DNA clastogenic-cross linking*), tales como diepoxibutano (DEB) o mitomicina C (MMC). Los datos se reportan según la alteración estructural/célula; también se reporta el porcentaje de células con alteraciones, usualmente entre 10-20% de las células. En el proceso se deben utilizar sangres control: negativas (personas sanas) y positivas por quebraduras cromosómicas.

En el análisis se observa la presencia de quebraduras cromosómicas o alteraciones como gaps, rearrreglos, figuras radiales, intercambio, endorreduplicación, entre otros (Figura N° 12).



Figura N° 12. Representación de algunas quebraduras cromosómicas características en anemia de Fanconi.

BIBLIOGRAFÍA

Association for Clinical Cytogenetics. Professionals guidelines for clinical cytogenetics: acute lymphoblastic leukaemia. UK: Association for Clinical Cytogenetics; 2011.

Bench AJ, Erber WN, Scott MA. Molecular genetic analysis of hematological malignancies: I. Acute leukaemias and myeloproliferative disorders. *Clin Lab Haem* 2005; 27(3): 148-171.

Fenaux P, Kelaidi C. Treatment of the 5q- syndrome. *Hematology* 2006; 192-198.

Harrison CJ, Johansson B. Acute lymphoblastic leukemia. En: Heim S, Mittleman F (editores). *Cancer cytogenetics: chromosomal and molecular genetic aberrations of tumor cells*. 3 ed. New York: Wiley-Blackwell; 2009. p. 233-296.

Huret JL (editor). *Atlas of genetics and cytogenetics in oncology and haematology*. (Versión en Internet). Francia: University Hospital of Poitiers; 2012: Consultado en: <http://atlasgeneticsoncology.org/>

Landstrom AP, Tefferi A. Fluorescent in situ hybridization in the diagnosis, prognosis, and treatment monitoring of chronic myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 2006; 47(3): 397-402.

Micale MA. Classical and molecular cytogenetic analysis of hematolymphoid disorders. En: Crisan D (editor). *Hematopathology, genomic mechanisms of neoplastic diseases*. New York: Humana Press; 2011. p. 39-77.

Oliva R, Vidal JM. *Genoma humano. Nuevos avances en investigación, diagnóstico y tratamiento*. Barcelona: Universidad de Barcelona; 2006.

Shaffer LG, McGowan J, Schmid M. *ISCN (2013): an international system for human cytogenetic nomenclature*. Basel: Karger; 2013.

Sreekantaiah C. FISH panels for hematologic malignancies. *Cytogenetic Genome Res* 2007; 118(2-4): 284-296.

Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. 4 ed. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2008.

Tjio JH, Levan A. The chromosome number of man. *Hereditas* 1956; 2(1-2): 1-6.

Tojo M. Valor de la técnica FISH para la detección de translocaciones en linfomas no Hodgkin, linfoma folicular, linfoma de células del manto y linfoma B de células grandes. España: Universidad de Santiago de Compostela; 2009.

Ventura R, Martin-Subero J, Jones M, McParland J, Gesk S, Mason D, et al. FISH analysis for the detection of lymphoma-associated chromosomal abnormalities in routine paraffin-embedded tissue. *J Mol Diagn* 2006; 8(2): 141-151.

LA BIOLOGÍA MOLECULAR APLICADA A LA HEMATOLOGÍA

Dr. Carlos Santamaría Quesada
Dra. Melissa Granados Zamora

GENERALIDADES

Las técnicas en biología molecular han surgido en los últimos 20 años como complemento a los métodos tradicionales de morfología, citogenética e inmunofenotipo, para un correcto abordaje de los pacientes hematológicos. Sus orígenes se encuentran a partir de las primeras descripciones de la estructura de doble hélice del ADN, por Watson y Crick en 1953. Otras investigaciones posteriores también fueron esenciales en el desarrollo de esta tecnología. Por ejemplo, en 1958 Kornberg y colaboradores lograron purificar la ADN polimerasa I de un extracto proteico de *Escherichia coli*. En 1971, Khorana y otros propusieron una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando la enzima descrita por Kornberg; sin embargo, las limitaciones técnicas de la época imposibilitaron su aplicación. En 1985, Kary Mullis y colaboradores describieron en la revista *Science* una versión simple de la PCR para la amplificación de un fragmento específico de ácido nucleico. Tres años después, el mismo grupo simplificó el procedimiento al descubrir una ADN polimerasa termoestable purificada de *Thermus aquaticus* (Taq polimerasa).

Esta revolución se ha acelerado con la caracterización de la secuencia completa del genoma humano, que está permitiendo determinar de forma más rápida los genes alterados en la mayoría de las enfermedades hereditarias. Las hemopatías malignas, en específico, han tenido numerosas aportaciones, tal como lo demuestra la gran cantidad de aberraciones citogenéticas encontradas en estas enfermedades y la identificación del sustrato molecular en muchas de ellas. De hecho, las neoplasias hematológicas han sido una de las principales fuentes de hipótesis sobre carcinogénesis, ofreciendo algunas entidades en las que se pueden observar los diversos pasos que dan lugar al desarrollo de la neoplasia clínicamente evidente.

METODOLOGÍAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

Extracción de ácidos nucleicos

El estudio de la biología molecular se basa en la detección cualitativa de una secuencia nucleotídica

específica de un gen determinado, o de la secuencia particular producto de una fusión anormal de dos segmentos cromosómicos (translocación), de la pérdida de material (deleción) o ganancia de material (adición) o incluso, del cambio de orden de una serie de nucleótidos en particular (mutación).

Para eso es necesario extraer el material genético (ADN o ARN) de las células de interés; en este caso los leucocitos o cualquier otra célula nucleada, según la muestra que se tenga (por ejemplo, una biopsia de ganglio).

Extracción de ADN

En general, para los estudios moleculares se prefiere utilizar el ADN en lugar del ARN, por su buena estabilidad y fácil extracción.

La extracción del ADN se puede dividir en cuatro pasos, los cuales han sido incorporados en una gran variedad de *kits* e instrumentos, para facilitar el procedimiento:

- 1. Ruptura de la membrana celular:** se realiza por medio de detergentes (como el dodecil sulfato de sodio -SDS-), enzimas o agentes desnaturalizantes (como el hidrócloruro de guanidina o el tiocianato de guanidina).
- 2. Eliminación de proteínas:** este proceso se hace por medio de enzimas proteolíticas tipo proteinasa K, en algunos casos en conjunto con SDS y asociado también a EDTA como inhibidor de ADNasas. Adicionalmente, se puede incluir una ARNasa tipo ribonucleasa A bovina, para la eliminación de ARN.
- 3. Concentración de ADN:** mediante la precipitación con etanol y la inclusión de un catión monovalente (tipo acetato de sodio o acetato de amonio), se induce un cambio estructural en el ADN, que causa agregación y precipitación de este.
- 4. Disolver ADN:** una vez concentrado el ADN, se procede a disolverlo cambiando las condiciones químicas con un buffer ligeramente alcalino, como el Tris-EDTA (buffer TE) o incluso agua libre de ADNasa.

La *extracción con columnas* de ADN utiliza ese mismo fundamento explicado, pero acoplado a una membrana de sílica, la cual permite que cuando las células están lisadas, el ADN liberado se adhiera a la columna debido al bajo pH de la sílica y a la concentración de sales de los buffer de lisis. Una vez unido el material genético, se pasan varios buffer de lavado que contienen cantidades decrecientes de alcoholes, para después eluir la columna con un buffer o simplemente agua, que modifican el pH, y con ello liberan el ADN, el cual puede ser recolectado por centrifugación.

La otra alternativa es la *extracción automatizada de ADN*. En este caso el principio químico se mantiene, solo que en la vasta mayoría de equipos que se encuentran disponibles en el mercado se utilizan "perlas magnéticas" (*magnetic beads*), que son el soporte donde se adhiere el ADN una vez que se lisan las células con una mezcla de hidrócloruro de guanidina y SDS. Esto se logra en un medio de pH ácido, donde las perlas se cargan positivamente, atrayendo al ADN, que tiene carga negativa (por los grupos fosfatos). Después se hacen los lavados respectivos con alcoholes para terminar eluyendo el ADN con un cambio a pH básico.

Extracción de ARN

A pesar de las bondades de utilizar ADN, la mayoría de análisis en hematología oncológica (en especial de leucemias) se hace con ARN, lo que implica mayores cuidados en el trabajo de laboratorio y un protocolo más riguroso de las muestras. Es importante recordar que las ARNasas capaces de destruir la muestra de interés se encuentran en todo lugar, desde las mesas de laboratorio, hasta en los fluidos corporales (sudor, saliva, etc.); de ahí la importancia de limpiar siempre las áreas de trabajo con cloro o algún eliminador comercial de ARNasas, además de usar permanentemente guantes libres de polvo y gabacha.

Existen dos razones fundamentales para el uso de ARN:

1. La mayoría de translocaciones de importancia en leucemias involucran múltiples sitios de ruptura, abarcando distancias hasta de 200.000 pares de bases (pb). Tomando en cuenta que una PCR de alta eficiencia alcanza para amplicones menores de 1.000 pb, y con enzimas especiales quizás hasta 10.000 pb, se entiende que la amplificación de estas regiones de ruptura no es posible. La gran mayoría de estos puntos de ruptura son intrónicos, por lo que el uso de ARN permite tener un solo producto de PCR.
2. Con el estudio de ADN solo se puede ver la presencia/ausencia de una secuencia, o a lo sumo replicones de número anormal; mientras que el ARN permite conocer la expresión de un transcrito de fusión, mutación o gen de interés, lo cual es importante en el diagnóstico y, sobre todo, en el seguimiento de la *enfermedad mínima residual*, es decir, el grupo de células remanentes que quedan posterior a someter al paciente a quimioterapia y que por definición son resistentes al tratamiento y que al final son las responsables de futuras recaídas.

El aislamiento del ARN puede obtenerse con una amplia variedad de protocolos, dependiendo del tipo de tejido de origen. Sin embargo, el método más empleado es el descrito por Chomczynski y Sacchi, basado en una extracción química de tiocianato de guanidina, fenol y cloroformo. Comercialmente a la mezcla de tiocianato de guanidina y fenol se le conoce como reactivo de *Trizol*®, con el cual se puede obtener ADN, ARN y proteína, aislados de una misma muestra.

El tiocianato de guanidina actúa como un *agente caotrópico*; es decir, una sustancia que desnaturaliza macromoléculas, como las proteínas, afectando las interacciones intramoleculares, tales como enlaces covalentes e interacciones hidrofóbicas. Además, la mezcla de *Trizol*® protege la integridad del material nucleico.

Cuando se recibe en el laboratorio una muestra de sangre periférica o de médula ósea, se procede a una centrifugación leve para extraer el anillo de leucocitos y descartar la mayoría de plasma rico en plaquetas y eritrocitos. La muestra resultante se mezcla con un agente lisante (cloruro de amonio) que elimina los glóbulos rojos restantes, que carecen de material genético para analizar y, además, poseen ingentes cantidades de hemoglobina, la cual es un reconocido inhibidor de la PCR. La razón de este fenómeno no se tiene clara, aunque se teoriza que el catión Fe^{2+} de grupo heme compite con el MgCl_2 , que es un cofactor fundamental para la enzima polimerasa.

Una vez obtenidos los leucocitos, se lava el exceso de cloruro de amonio con PBS y se procede a mezclarlo con el *Trizol*®. Esta suspensión de leucocitos lisados + *Trizol*® puede utilizarse de inmediato o preservarse por años a -20°C . El siguiente paso es agregar cloroformo al *Trizol*® con la muestra en estudio. Con un fuerte vortex, se obtiene una suspensión lechosa, donde los ácidos nucleicos ya están desprovistos de toda protección, por lo que se tiene que trabajar en todo momento con hielo para disminuir la acción de las ARNasas.

Después de una incubación por algunos minutos, esta mezcla de tiocianato de guanidina-cloroformo se centrifuga a alta velocidad (> 12.000 rpm) para obtener tres capas: una superior acuosa, que contendrá el ARN de interés; una capa blanquecina intermedia que incluye el ADN; y una capa inferior fenólica que contiene las proteínas.

El ARN se puede recolectar con sumo cuidado y pasar a un tubo Eppendorf nuevo que tenga isopropanol, alcohol que ayuda en la precipitación del ARN, de forma análoga a lo que hace el etanol con el ADN. El ARN en el isopropanol se conserva al menos por 24 horas a -20°C , para obtener una cantidad suficiente que permita realizar la retrotranscripción (explicada más adelante).

El ARN también puede ser obtenido por columnas de sílica o bien, equipos automatizados. Sin embargo, en hematología estos procesos no resultan útiles, pues la cantidad recuperada de ARN es poca para el proceso posterior de retrotranscripción y PCR, especialmente para el seguimiento de la enfermedad mínima residual.

Retrotranscripción

El ARN es una molécula muy inestable, expuesta a una gran cantidad de ARNasas en el medio. Además, se degrada fácilmente a las temperaturas que suelen utilizarse en una PCR, en especial por encima de los 85°C . Es por ello que se requiere una alternativa al ARN, que evite estos inconvenientes.

En una retrotranscripción (RT) se busca hacer una copia exacta del ARN, pero obteniendo lo que se conoce como *ADN copia*, el cual es más estable. Esto se logra con una retrotranscriptasa, enzima que se encuentra en retrovirus capaz de sintetizar una copia de ADN a partir de una plantilla de ARN, al contrario de lo que hacen la mayoría de organismos vivos. Esto implica la sustitución de residuos de uracilo en ARN por timina en ADN copia.

Si se hiciera una comparación entre la retrotranscripción y la PCR, se podrían destacar algunas diferencias entre ambas reacciones enzimáticas. Por ejemplo, el objetivo de la PCR es amplificar (obtener muchas copias idénticas) un segmento genético definido; mientras que el objetivo de una RT es obtener una copia del ARN, para usarlo como molde. Ese segmento genético en una PCR es definido por dos pequeñas secuencias de nucleótidos, que limitan el fragmento a amplificar. En una RT, si bien se puede retrotranscribir un segmento específico por medio de *primers*, lo habitual es poner un grupo numeroso de oligonucleótidos de pequeño tamaño (entre 6-8 nucleótidos; hexámeros

u octámeros), de secuencia totalmente aleatoria, que se unen de manera inespecífica a todo lo largo del ARN, para iniciar desde allí el proceso de transcripción inversa. Otra alternativa es colocar oligonucleótidos con colas de poli-T, los cuales solo se acoplarán al ARN mensajero (único que posee una cola de poli-A), si lo que se desea transcribir es la información genética que verdaderamente se está expresando a proteína a través del ARNm.

En una PCR se utiliza un programa que repite muchas veces (ciclaje), de forma tal que se tenga un número alto de copias idénticas. Por el contrario, la RT consta de un solo ciclo, con una temperatura de unión entre hexámeros/octámeros y ARN suficientemente baja ($40-45^{\circ}\text{C}$) como para haya una unión inespecífica entre ellos, y con bastante tiempo (más de 30 minutos) para permitir que la reacción se extienda lo más posible. Una vez obtenido el ADN copia, se puede realizar cualquier método molecular (PCR cualitativa, PCR en tiempo real, secuenciación, etc.), con una estabilidad semejante a la que se tiene con ADN.

PCR cualitativa

Mediante las técnicas de PCR cualitativa se puede efectuar la amplificación selectiva de un fragmento específico de ADN, permitiendo la detección de un número pequeño de células neoplásicas en las enfermedades donde se genera un fragmento de ADN tumor-específico. Este fragmento se encuentra delimitado por dos secuencias de 15-30 nucleótidos complementarios al ADN de interés y que se denominan oligonucleótidos, cebadores o *primers*, los cuales se mezclan en una proporción definida con buffer de KCl o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Taq polimerasa, Mg (cofactor de la enzima) y desoxinucleótidos (dNTP), más agua libre de ADNasa y el ADN de interés. Esta mezcla posteriormente se somete a una serie de 30-40 ciclos de temperatura en un termociclador, que en términos generales cumple tres etapas: separación de la doble hebra de ADN (95°C), unión de *primers* a la secuencia de interés -*annealing*- ($55-65^{\circ}\text{C}$) y elongación de la hebra complementaria con los respectivos dNTP ($70-73^{\circ}\text{C}$). Por último, para separar los distintos fragmentos, el producto de PCR se somete a una electroforesis sobre un gel de agarosa con bromuro de etidio (EtBr), otro agente intercalante (tipo GelRed, SYBR Green), u otros agentes cromogénicos que evitan los potenciales riesgos que conlleva trabajar con un agente teratogénico, como lo es el bromuro de etidio. Los productos de PCR migran y se separan según el peso molecular, visualizándose como "bandas", donde el EtBr se intercala en la doble hélice del ADN emitiendo fluorescencia. Para determinar el tamaño del producto en pares de bases (pb), se agrega una escalera de

peso molecular, con mezclas de fragmentos de ADN de número de pb conocido (Figura N° 1).

Los estudios pueden realizarse a partir de ADN o de ARN; este último con el inconveniente que es una molécula fácilmente degradable y expuesta a gran cantidad de ARNasas del ambiente. Los análisis de los reordenamientos *V(D)J* de las inmunoglobulinas o el receptor de células T (TCR), así como aquellas translocaciones donde el punto de rotura es preciso y el fragmento de PCR a amplificar es menor de 2 Kb, se realiza a partir de ADN (por ejemplo, t(14;18) *Bcl-2/JH* observado en linfoma folicular). Por el contrario, en la mayoría de translocaciones relacionadas a leucemias agudas y a leucemia mieloide crónica -LMC- (como la t(9;22) o cromosoma Philadelphia), el punto de rotura es variable, afectando a zonas muy amplias de ADN, lo que imposibilita su estudio a partir de ADN genómico. Sin embargo, en estos casos el punto de rotura generalmente afecta regiones intrónicas, lo que permite

su detección a partir de ARN tras su transformación a ADN copia, mediante técnica de transcriptasa inversa, seguida de reacción de PCR (técnica de RT-PCR).

La sensibilidad de la técnica de la PCR cualitativa puede alcanzar 10^{-4} , lo que significa que permite discriminar una célula tumoral entre 10.000 células normales. Para lograr una mayor sensibilidad (hasta 10^{-5}), se puede realizar una PCR anidada (*nested PCR*), donde el producto de una primera PCR se somete a un nuevo proceso de termociclado, utilizando *primers* internos que reconocen secuencias dentro de este producto. Para una mayor especificidad de la enzima, pueden emplearse otras variantes, como hacer el *annealing* con un programa de temperaturas cambiantes llamado *touchdown*, donde la temperatura va disminuyendo poco a poco conforme la reacción va avanzando (comúnmente 0,5-1 °C por ciclo hasta alcanzar 55-58 °C).

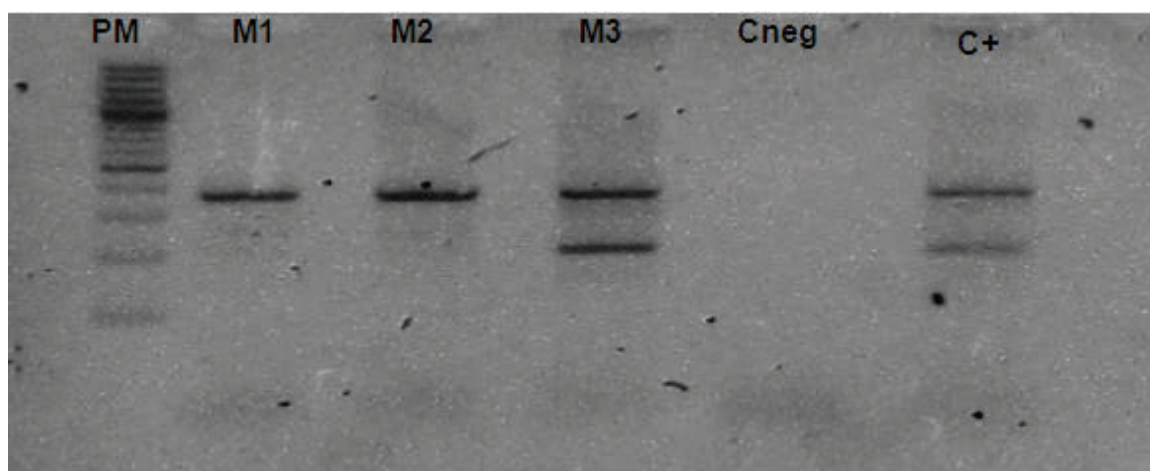


Figura N° 1. Ejemplo de una determinación por PCR cualitativa de la mutación V617F del gen *JAK2*. Todas las muestras (M1, M2, M3) tienen una banda de 364 pb correspondientes a la secuencia del alelo salvaje de *JAK2*, mientras que la muestra M3 tiene otra banda de 204 pb que detecta la mutación puntual G1849T, que da la sustitución de una valina por una fenilalanina en el aminoácido 617. Cneg: Control de no amplificación (agua). C+: control mutado V617F heterocigota. PM: escalera de peso molecular de 100 pb.

A pesar de su alta sensibilidad, especificidad y versatilidad, la PCR no es una técnica exenta de limitaciones. Un problema importante son los falsos positivos debidos a la contaminación de muestras, principalmente en los métodos basados en ARN. Por ello, es imprescindible la inclusión de muestras control y extremar las medidas para evitar la contaminación, como el uso de guantes y mascarillas, limpieza de la zona de trabajo con hipoclorito de sodio o soluciones de eliminación de ARNasas y ADNasas, así como la separación física de las áreas de pre-PCR (procesamiento de la muestra) y post-PCR (donde se ubican los termocicladores y demás equipamiento).

En el otro extremo se situarían los falsos negativos por emplear muestras de mala calidad (por ejemplo, ARN degradado), por lo que se debe realizar un control de la reacción amplificando genes normales constitucionales, los cuales siempre deben dar una señal positiva para que la prueba tenga validez (por ejemplo, Gen *ABL* o *GAPDH*).

Otro aspecto metodológico relevante es la necesidad de estandarización de dichas técnicas, por las distintas variaciones interlaboratorios observadas. Con este fin, se han realizado diferentes estudios multicéntricos, destacando el trabajo del grupo europeo del BIOMED

I, el cual logró estandarizar un mismo protocolo para las translocaciones de mayor incidencia en leucemia

linfocítica aguda (LLA) y leucemia mielocítica aguda (LMA) (Cuadro N° 1).

Cuadro N° 1. Genes de fusión estandarizados por el grupo BIOMED-I para su determinación por RT-PCR en leucemias agudas			
Aberración cromosómica	Gen de fusión	Incidencia	Pronóstico
t(1;19)(q23;p13)	<i>E2A-PBX1</i>	5-6% LLA-B en niños 3% LLA-B en adultos	Desfavorable, pero responde bien a los tratamientos actuales.
t(4;11)(q21;q23)	<i>MLL-AF4</i>	50-70% LLA-B < 1 año 5% LLA-B > 1 año	Muy adverso.
t(8;21)(q22;q22)	<i>RUNX1-RUNX1T1</i> [<i>AML1-ETO</i>]	8-12% LMA (20-40% M2)	Favorable.
t(9;22)(q34;q11)	<i>BCR-ABL p190</i>	3-4% LLA-B en niños 30-40% LLA-B en adultos 5% LMC 1% LMA	Desfavorable en LLA y LMA.
t(9;22)(q34;q11)	<i>BCR-ABL p210</i>	2-3% LLA-B en niños 10-20% LLA-B en adultos 90% LMC 1% LMA	Favorable por tratamiento con Glivec.
t(12;21)(p13;q22)	<i>ETV6-RUNX1</i> [<i>TEL-AML1</i>]	25-30% LLA-B en niños	Favorable.
t(15;17)(q22;q21)	<i>PML-RARα</i>	> 95% LMA-M3 (LPA)	Favorable por tratamiento con ATRA.
inv(16)(p13;q22)	<i>CBFB-MYH11</i>	10% LMA (50% M4eo)	Favorable.
del(1)(p32;p32)	<i>SIL-TAL1</i>	10-25% LLA-T en niños 5-10% LLA-T en adultos	Incierto.

Análisis de fragmentos (*gene scanning*)

Una alternativa a la PCR convencional es efectuar la reacción con un *primer* marcado con un fluorocromo. La prueba se ejecuta de forma similar, solo que en vez de utilizar un gel de agarosa para la electroforesis, se emplea un escáner o secuenciador, que posee un soporte de poliacrilamida o sílice acoplado a un láser que excita el fluorocromo, el cual a su vez emite fluorescencia que es detectada por el scanner al pasar el producto frente a él durante la corrida electroforética. Para determinar el tamaño en pb del producto de interés, antes de cargar las muestras en el equipo, se agrega a cada tubo una mezcla de fragmentos de ADN de tamaño conocido, análogo a la utilizada en la PCR convencional, solo que los productos empleados acá también han sido marcados con un fluorocromo que emite una longitud de onda distinta al empleado en los productos de PCR (Figura N° 2). Aunque es una técnica cualitativa, tiene la ventaja de que elimina la lectura subjetiva que se hace sobre un gel de agarosa,

además de que se puede semi-cuantificar la expresión del gen, al integrar el área bajo el pico de producto que se forma y comparar esta cuantificación con la de un control interno de expresión conocida. Sin embargo, esta técnica en comparación con la PCR tradicional, es muy laboriosa y relativamente costosa en equipos y reactivos, por lo que su utilidad en la rutina diagnóstica se restringe a detectar inserciones o deleciones en genes de interés clínico, como el *FLT3*, cuyas inserciones en tandem (*FLT3-ITD*) son factor independiente de mal pronóstico en LMA (incluso, algunos autores postulan que la cantidad de pb inserta también tienen implicación pronóstica); o bien, en detectar varios productos marcados con distintos fluorocromos en PCR multiplex, es decir, con más de una pareja de *primers* analizándose de manera simultánea en el mismo tubo.

El ejemplo de mayor aplicación en hematología de PCR multiplex fluorescente, es el análisis de *quimerismo*, cuyo objetivo es valorar si la médula

ósea trasplantada en un paciente se ha implantado exitosamente o al contrario, está siendo rechazada por el receptor. La técnica se basa en el análisis de una serie de *short tandem repeats* (STR), marcadores genéticos compuestos de una repeticiones cortas de 4-6 nucleótidos, que se repiten en una cantidad que es diferente (de 10 a más de 30 veces) en cada individuo. Cada STR está marcado con un fluorocromo, que permite analizar combinaciones de 13 a 30 STR de forma simultánea. Al evaluar al menos 13 de estos marcadores, se garantiza que se va a tener un perfil de

repeticiones prácticamente único para cada persona. De esta forma, se puede analizar en una muestra de sangre o de médula ósea si la hematopoyesis de un paciente trasplantado, denominado *quimera*, es del donador (quimera completa, trasplante exitoso), es una mezcla entre el donador y el receptor (quimera mixta, que requiere intervención terapéutica inmediata), o bien, si es toda del paciente (fracaso de trasplante, con alto riesgo de recaída). Esta metodología es la misma que se utiliza para identificación humana en análisis forenses y en casos de estudios de paternidad.

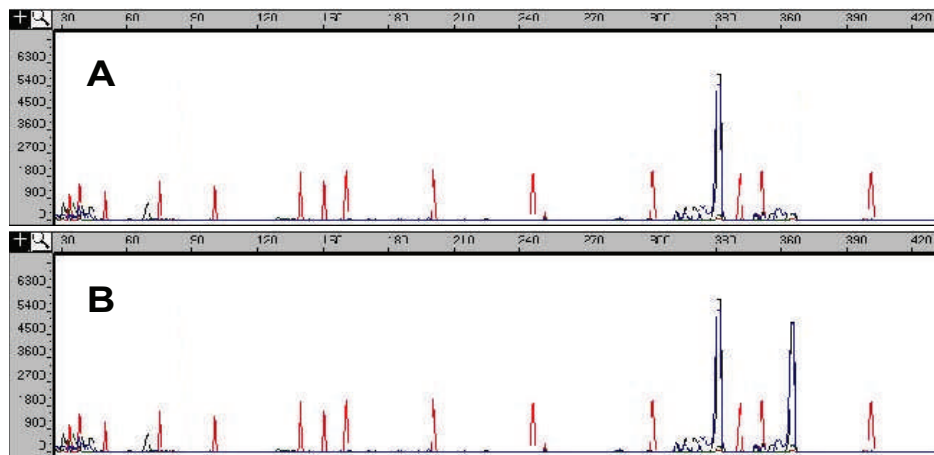


Figura N° 2. Ejemplo de una determinación por *gene scanning* de la duplicación en tandem del gen *FLT3* (FLT3-ITD). Se puede observar un pico correspondiente a un gen normal de 330 pb (A) y un alelo con una inserción de 33 pb junto al alelo normal, indicado por una flecha (B). Los picos rojos corresponden a la escalera de peso molecular, análoga a la que se usa en PCR cualitativa.

En el caso de *gene scanning*, se utiliza como escalera una mezcla de productos de tamaño conocido de pares de bases y marcados con un fluorocromo (por lo general ROX).

PCR cuantitativa en tiempo real

La técnica de PCR cuantitativa por tiempo real (RQ-PCR) ha surgido como una alternativa a la PCR convencional para el estudio de hemopatías malignas, a partir de los estudios multicéntricos efectuados en Estados Unidos (con el *North American Cooperative Group*) y en Europa (con el *Europe Against Cancer -EAC- Program* y el *German Acute Myeloid Cooperative Group*, principalmente).

La RQ-PCR permite la cuantificación del producto de PCR durante la fase exponencial del proceso de amplificación de la PCR, lo cual contrasta con la detección en el punto final de la reacción en la PCR convencional (Figura N° 3).

La detección en “tiempo real” se logra al medir una señal fluorescente durante o inmediatamente después de cada ciclo de PCR, lo que permite tener resultados cuantificables de manera continua, sin necesidad de manejo post-PCR. La fluorescencia viene dada por una variedad de sondas o moléculas que se unen al

producto amplificado:

- SYBR Green I:** esta molécula constituye la forma más simple de RQ-PCR. Tiene la capacidad de intercalarse dentro de la curvatura menor del ADN de doble banda (ADN db), y estando ahí incrementa su emisión de fluorescencia a 520 nm, la cual aumenta conforme más producto de PCR (y por ende, más ADN db) se encuentre. Aunque es un proceso simple y aplicable a cualquier reacción, su inconveniente radica precisamente en la ausencia de especificidad y el riesgo de falsos positivos.
- Sondas de hidrólisis:** el análisis de RQ-PCR por este método aprovecha la capacidad exonucleasa 5'→3' de la Taq polimerasa para detectar productos de PCR **específicos**. Estas sondas, denominadas comercialmente sondas TaqMan®, son fragmentos de ADN conjugados en 5' con un fluorocromo reportero *-reporter-* y en 3' con un fluorocromo amortiguador *-quencher-*, y complementarios a una región específica del producto que se está amplificando.

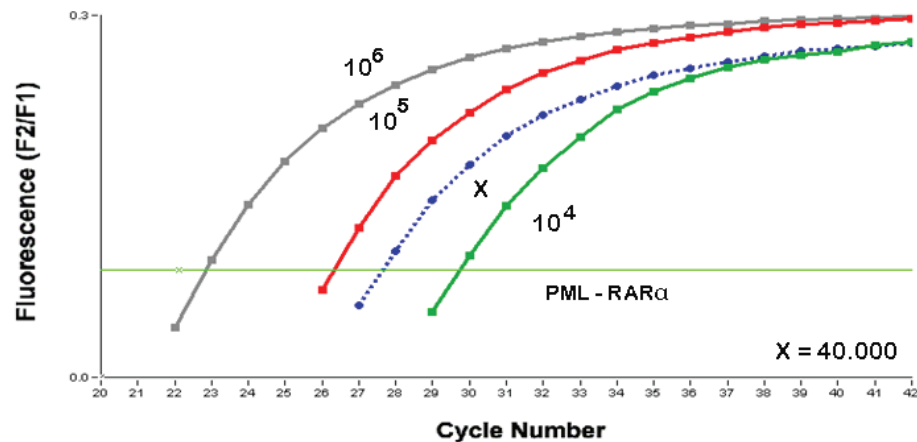


Figura N° 3. Ejemplo de una determinación por RQ-PCR del gen de fusión *PML-RARα*, comparando la curva incógnita (x) con tres estándares de concentración (número de copias) conocida del gen de fusión *PML-RARα*.

Si la sonda se mantiene intacta, la fluorescencia emitida por el reportero es “absorbida” por el amortiguador. En cuanto se inicia la reacción de PCR, la sonda es desplazada y a la vez, hidrolizada por la Taq polimerasa, con lo cual la fluorescencia del reportero puede ser detectada (Figura N° 4a). Conforme se amplifique más producto de PCR, mayor fluorescencia será emitida.

en la secuencia del producto de PCR), la luz emitida por el donador excita el fluorocromo del receptor, generando emisión de fluorescencia, proceso conocido como transferencia de energía de resonancia fluorescente (o FRET, por sus siglas en inglés). Igual que el anterior, conforme más producto de PCR **específico** se tenga, mayor FRET se detectará (Figura N° 4b).

c) **Sondas de hibridización:** consiste en el uso de dos sondas complementarias de la secuencia en estudio, una *donadora* con un fluorocromo en su extremo 3' y una *aceptora* con el fluorocromo en su extremo 5'. Cuando las dos sondas están en proximidad (separadas solo por 2-4 nucleótidos

d) **Otras:** en el mercado actual se consiguen otro tipo de sondas fluorescentes y específicas, como las *molecular beacon*, la *scorpions* y las sondas *MGB*, aunque su uso no es tan difundido como las anteriores.

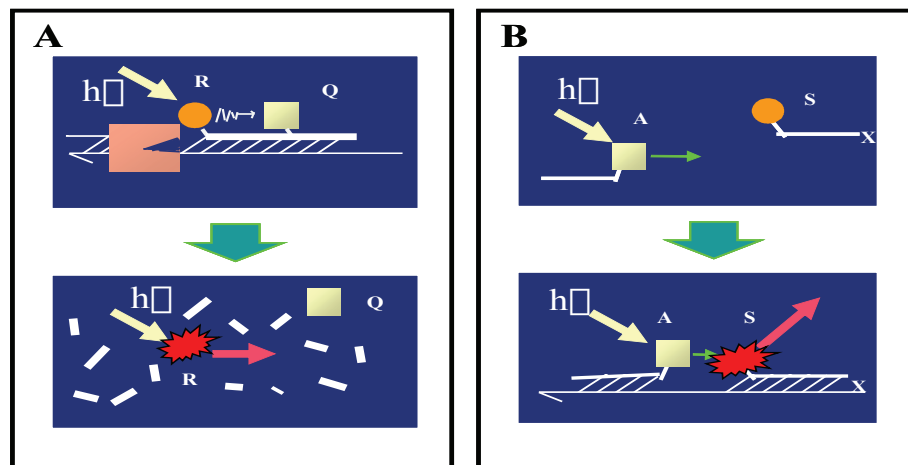


Figura N° 4. Fundamento de las sondas empleadas para RQ-PCR. Las sondas de hidrólisis (A) traen acoplados un fluorocromo reportero -R- y otro amortiguador -Q-; al romperse por acción de la Taq polimerasa, el reportero puede emitir fluorescencia. Con las sondas de hibridización (B), la señal es detectable cuando el fluorocromo donador -A- transmite su energía a un receptor -S-.

En comparación con la PCR cualitativa, la RQ-PCR presenta una serie de ventajas técnicas, como un alto rendimiento, parcial automatización del proceso y menor riesgo de falsos positivos debidos a contaminación cruzada. Sin embargo, los tres aspectos que la convierten en una tecnología más potente son:

1. La posibilidad de introducir un control interno para evaluar la integridad del ARN y la retrotranscripción a ADN copia en cada grupo de muestras.
2. Un seguimiento preciso de la cinética de la carga tumoral.
3. Una mayor sensibilidad analítica respecto a RT-PCR (hasta 10^{-6}).

Además, se cuenta con diversos esfuerzos para establecer protocolos uniformes para su aplicación clínica, como lo logrado en el 2003 con el programa de *Europe Against Cancer*, para la estandarización de los protocolos de PCR en tiempo real de las principales translocaciones observadas en leucemias agudas (las mismas que analizó el proyecto BIOMED I para PCR cualitativa), y la colaboración desde el 2010 entre distintos laboratorios para determinar una unidad mundialmente aceptada (la escala internacional o *international scale* -IS-) para la cuantificación de *BCR-ABL* en el seguimiento de los pacientes con leucemia mieloide crónica.

Secuenciación

Como su nombre lo indica, el objetivo de estas técnicas es lograr identificar la secuencia específica de nucleótidos de un fragmento de ADN. En resumen, se realiza una PCR para amplificar el gen o translocación de interés. Este producto de PCR es purificado por una enzima tipo EXO-SAP, que identifica y destruye el material genético de banda sencilla (como los dNTP y *primers*), dejando intacto el producto de PCR que es doble banda, para posteriormente someter el producto purificado a una reacción de secuenciación, utilizando el método de Sanger, denominado de esta forma en honor a Frederick Sanger (1918-2013), quien obtuvo uno de sus dos Premios Nobel (1980) por la descripción de esta metodología.

Esta técnica se basa en el empleo de dideoxinucleótidos (ddNTP) que carecen del grupo hidroxilo en su extremo 3', además de estar marcados con un fluorocromo distinto para el ddATP, ddCTP, ddTTP y ddGTP. Estos ddNTP se mezclan en una proporción 1:3 con dNTP no modificados y no marcadores. Cuando inicia la reacción, dNTP y ddNTP compiten por agregarse a la cadena de ADN que se está sintetizando. Si un dNTP se agrega, la síntesis de ADN continúa. Sin embargo, cuando un ddNTP se incorpora a una cadena de ADN en crecimiento, esta cadena no puede continuar

elongándose, ya que la ADN polimerasa necesita un extremo 3' OH para añadir el siguiente nucleótido y el ddNTP incorporado carece de ese grupo hidroxilo. Este fragmento se rompe y se debe iniciar nuevamente una elongación de otra cadena de ADN.

Al final de la reacción, se espera tener fragmentos desde un nucleótido hasta el tamaño total del producto de PCR amplificado; todos marcados en su extremo 3' por un fluorocromo diferente, correspondiente a uno de los cuatro nucleótidos (A, C, G o T) producto de los ddNTP modificados y marcados. Estos fragmentos se someten a una electroforesis sobre un soporte de poliacrilamida u otro polímero sintético de sílica acoplado a una fuente de luz que excite los fluorocromos, que constituye el centro medular de un equipo de secuenciación (*Genetic Analyzer* en inglés). Se espera que los fragmentos migren según su tamaño, por lo que el lector del secuenciador detectará una consecución de señales fluorescentes, que corresponderá con la secuencia del gen amplificado. A pesar de su complejidad, esta metodología es muy útil para determinar los arreglos de Ig o TCR en LLA-B o LLA-T; además de permitir identificar subgrupos de HLA tipo II para trasplante de médula ósea o detectar mutaciones que confieran resistencia a medicamentos (por ejemplo, la mutación T315I en pacientes resistentes a inhibidores de tirosina quinasa, tratamiento dado a personas con leucemia cromosoma Philadelphia positivo) (Figura N° 5).

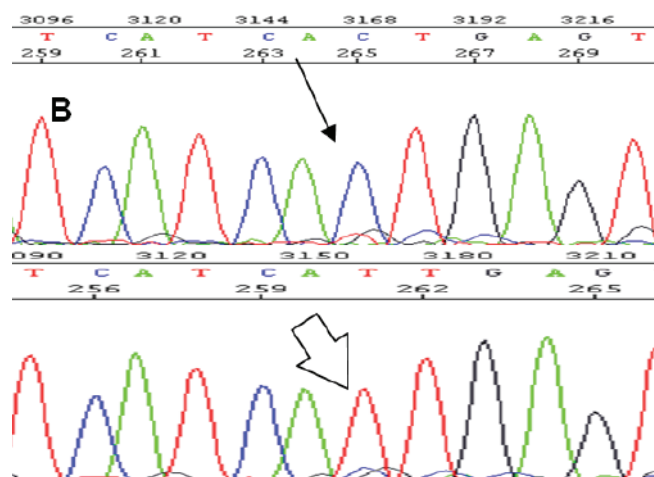


Figura N° 5. Ejemplo de la determinación de la mutación T315I en el gen *ABL*, en una persona con LMC y resistente a Glivec. Puede observarse el cambio de base C>T (es decir, de citosina -en azul- a timina -en rojo-), lo que induce un cambio en el codón de ACT (correspondiente a un treonina) al aberrante ATT (correspondiente a una isoleucina) en el aminoácido 315 del dominio tirosina quinasa del gen *ABL*.

APLICACIONES CLÍNICAS

Los aportes más relevantes de la biología molecular se han visto reflejados en los procesos leucémicos, más que en cualquier otro trastorno hematológico u oncológico en general. Los distintos tipos de genes blancos que se detectan por las técnicas de biología molecular tienen impacto clínico sobre el manejo del paciente en su diagnóstico y en el seguimiento de su enfermedad. La determinación puede evidenciar genes de fusión producto de translocaciones cromosómicas detectadas o no por citogenética (por ejemplo la

t(12;21), la cual no se detecta por citogenética, aunque su producto *ETV6-RUNX1* [*TEL-AML1*] sí se detecta por RT-PCR), rearrreglos monoclonales de la región V(D)J de las inmunoglobulinas para síndromes linfoproliferativos de línea B (SLP-B) o del receptor de células T para SLP-T, mutaciones de genes u oncogenes (tipo *FLT3*, *NPM1*, *JAK2* o *RAS*), expresión aberrante de genes (gen *PRAME* relacionado a melanoma, pero expresado en LMA) o sobreexpresión de genes inespecíficos (gen *WT1* del tumor de Wilms) (Cuadro N° 2).

Cuadro N° 2. Análisis comparativo de los distintos genes blanco utilizados en el diagnóstico molecular en onco-hematología			
Gen blanco	Aplicabilidad	Ventajas	Desventajas
Rearreglos de Ig/TCR	LLA-B: 90-95% LLA-T: 90-95% LMA no M3: 5-10%	- Específico de cada paciente. - Bajo riesgo de contaminación. - Alta estabilidad del ADN.	- Intensa labor de identificación de la secuencia blanco. - Evolución clonal. - Mimetismo de células normales.
Genes de fusión (ADN)	Solo para linfomas. No útil para LLA, LMA o LMC.	- Específico de cada paciente. - Bajo riesgo de contaminación. - Alta estabilidad del ADN. - Relacionado a oncogénesis. - Secuencia blanco estable. - Ausencia de expresión en células normales.	- Intensa labor para identificar los puntos exactos de ruptura. - Relativa baja incidencia.
Genes de fusión (ARN)	LLA-B: 30-50% LLA-T: 10-25% LMA no M3: 20-40% LPA y LMC > 95%	- Identificables con un pequeño número de <i>primers</i>. - Relacionado a oncogénesis. - Secuencia blanco estable. - Ausencia de expresión en células normales.	- No es específico de cada paciente. - Inestabilidad del ARN. - Relativa baja incidencia.
Otros genes (ARN) <i>FLT3</i> -ITD <i>WT1</i> <i>HOX11L2</i> <i>PRAME</i>	Varía según el tipo de gen y la enfermedad en estudio.	- Secuencia blanco estable. - Relacionado a oncogénesis. - Ausencia o baja expresión en células normales. - Identificables con un pequeño número de <i>primers</i>.	- No es específico de cada paciente. - No es específico de tumor. - Inestabilidad del ARN.

Diagnóstico

Al momento de diagnosticar un proceso leucémico, la detección de las diversas alteraciones genéticas ayuda a establecer dos parámetros muy importantes:

a. Clasificación: como se ha mencionado en otros capítulos, la Organización Mundial de la Salud publicó en el 2008 una nueva clasificación de leucemias, donde se integran los hallazgos morfológicos, citogenéticos y moleculares para dar una definición más real de los trastornos oncohematológicos. Por ejemplo, aparece un nuevo grupo de LMA con translocaciones recurrentes (LPA con la t(15;17) o alguna de las variantes de *PML/RAR α* , al igual que la LMA con t(8;21) *RUNX1-RUNX1T1* [AML-ETO] o la LMA con eosinófilos anormales e inv16 positiva), que las separa de la clasificación tradicional de la FAB (M0 a M7) y que se asocian a un pronóstico favorable dentro de las LMA. Incluso, se hace distinción para las LMA secundarias a síndromes mielodisplásicos, tratamientos alquilantes o asociadas a síndrome de Down; todas con su manejo clínico independiente entre sí.

b. Pronóstico: según la alteración cromosómica o gen evaluado, se pueden establecer subgrupos de riesgo bajo, medio o alto, que incide sobre el tipo de tratamiento que debe ser aplicado y sobre la supervivencia esperada del paciente. Por ejemplo, la LLA-B con *ETV6-RUNX1* es de buen pronóstico; mientras que las LLA-B con alteraciones del 11q23 tienen un pronóstico reservado. En las LMA, se sabe que la duplicación en tandem de la tirosina quinasa semejante a *fms* (*FLT3-ITD*) es de muy mal pronóstico; mientras que mutaciones en el gen de la nucleofosmina (*NPM*) tienen un factor positivo en la sobrevida de los pacientes.

Seguimiento

Una vez establecido el tipo y clasificación del trastorno hematológico, los hallazgos moleculares sirven para valorar el éxito de la terapia aplicada y la determinación de la *enfermedad mínima residual (EMR)*, término que define un pequeño grupo de células remanentes que queda en el organismo posterior a una quimioterapia (QTx) de inducción, las cuales, como ya se mencionó, son responsables de eventuales recaídas de los pacientes, son altamente resistentes a la QTx y presentan alta tasa de mortalidad.

Respuesta a tratamiento

Los ejemplos clásicos son la determinación del rearrreglo *BCR-ABL* en personas con LMC que están reci-

biendo el inhibidor de tirosina quinasa Glivec® (mesilato de imanitib), o la detección del *PML-RAR α* para los pacientes de leucemia promielocítica aguda (LPA) que reciben ácido transretinoico (ATRA). En el primer caso, una reducción de tres logaritmos en el número de copias de *BCR-ABL* (respecto al valor de diagnóstico) después de 12 meses de tratamiento, se considera una respuesta óptima al Glivec, denominada respuesta molecular mayor. En cuanto a la LPA, menos de 10 copias posterior al tratamiento de consolidación, se considera sin riesgo de recaída.

EMR

A través de técnicas moleculares, el seguimiento de la EMR en leucemias y linfomas puede utilizar dos tipos de marcadores:

1. Análisis de los *reordenamientos clonales* de los genes de las inmunoglobulinas (Igs) y del TCR, presentes en los síndromes linfoproliferativos B y T, entendiendo que el proceso hematológico surge a partir de un clon celular único.
2. Detección de *aberraciones cromosómicas* en las que se conocen los oncogenes implicados que dan lugar a regiones quiméricas de fusión características de diferentes enfermedades.

Metodológicamente, la primera estrategia es más compleja, ya que para ser específica y bastante sensible, requiere la secuenciación de las regiones clonoespecíficas V(D)J de cada paciente y posterior diseño de oligonucleótidos específicos de dichas regiones hipervariables. Por el contrario, en los estudios de las translocaciones cromosómicas solo se requiere realizar una o dos reacciones de PCR (PCR anidada) empleando *primers* consenso para todos los pacientes. No obstante, la primera metodología es más específica, ya que no es solo un marcador tumor específico, sino también un paciente específico.

EVALUACIONES SUGERIDAS SEGÚN PATOLOGÍA

Leucemia linfoblástica aguda

Con las opciones terapéuticas actuales, hasta un 80% de las leucemias linfoblásticas agudas (LLA) en niños y un 35% en adultos pueden ser curadas. Sin embargo, un grupo importante tiene cierta probabilidad de recaída, siendo el sexo masculino, el alto número de blastos, el inmunofenotipo tipo LLA-B nula (CD10^{neg}, CD19^{neg}) y las aberraciones cromosómicas adicionales, factores independientes de mal pronóstico al diagnóstico.

Numerosos estudios han demostrado que la detección temprana de la EMR, especialmente al finalizar el

tratamiento de inducción, son de vital importancia para anticipar futuras recaídas. Se recomienda la detección por RQ-PCR de las alteraciones cromosómicas antes descritas o bien, rearreglos a nivel de cadena pesada de inmunoglobulina (IgH) para LLA-B o receptor de células T (TCR) para LLA-T. En caso de carencia de RQ-PCR, al menos hacer la detección cualitativa de las respectivas translocaciones. Para LLA-T se puede

realizar la microdelección 1p32 (*SIL-TAL1*), presente en un 5-25% de estos pacientes, evaluando posibles marcadores a futuro, como NOTCH1, HOX11 y CALM-AF10, además de esperar los resultados de la pronta estandarización clínica para el estudio de clonalidad en LLA planteado por el *European Study Group* (Cuadro N° 3).

Cuadro N° 3. Análisis moleculares recomendados para el diagnóstico y seguimiento de las principales patologías leucémicas		
Entidad hematológica	Diagnóstico	EMR
LLA tipo B en niños	t(1;19)(q23;p13) t(4;11)(q21;q23) t(9;22)(q34;q11)p190 t(9;22)(q34;q11)p210 t(12;21)(p13;q22) Rearreglos de Ig	En caso de translocación POSITIVA: seguir EMR con este marcador. En caso de translocación NEGATIVA: clonalidad B.
LLA tipo B en adultos	t(1;19)(q23;p13) t(4;11)(q21;q23) t(9;22)(q34;q11)p190 t(9;22)(q34;q11)p210 Rearreglos de Ig	En caso de translocación POSITIVA: seguir EMR con este marcador. En caso de translocación NEGATIVA: clonalidad B.
LLA tipo T	Gen <i>SIL-TAL</i> Gen <i>HOX11L2</i> Rearreglos de TCR	En caso de translocación POSITIVA: seguir EMR con este marcador. En caso de translocación NEGATIVA: clonalidad T.
LMA no M3	t(8;21)(q22;q22) inv16(p13;q22) Gen <i>FLT3-ITD</i>	Translocación positiva FLT3 no es útil para EMR.
LMA no M3 con cariotipo normal	Mutaciones en NPM Gen <i>WT1</i> Gen <i>FLT3-ITD</i>	NPM o WT1. FLT3 no es útil para EMR.
LPA (M3)	t(15;17)(q22;q21) bcr1 t(15;17)(q22;q21) bcr2 t(15;17)(q22;q21) bcr3 Gen <i>FLT3-ITD</i>	Translocación positiva FLT3 no es útil para EMR.
LMC	t(9;22)(q34;q11)p190 t(9;22)(q34;q11)p210	Translocación positiva y en caso de mala respuesta al tratamiento buscar mutaciones en ABL.

En la actualidad han surgido nuevos marcadores para el diagnóstico y pronóstico de los pacientes con LLA-B, entre ellos delección de los genes *IKZF1*, *ERG* o genes de fusión que involucran el gen *CRLF2*. De estos, cabe destacar las delecciones a nivel del gen *IKZF1*, el cual codifica por IKAROS, proteína esencial en la maduración de los linfocitos B. Esta proteína posee varios motivos de dedos de zinc en la parte N-terminal de la proteína que unen ADN, lo que le permite funcionar como factor de transcripción, esencial para el proceso de maduración de linfocito B y otras

líneas celulares. La delección en *IKZF1* conduce a una pérdida de estos motivos de dedos de Zn, generando una proteína inactiva denominada IK6, que afecta el desarrollo normal del linfocito y genera el “segundo golpe” requerido para el proceso de leucemogénesis. La presencia de estas delecciones se observa con mayor frecuencia en LLA-B *BCR-ABL* positivas. A nivel clínico, se ha demostrado una fuerte asociación entre delecciones del gen *IKZF1* y peor pronóstico en LLA en general, tanto en LLA-B *BCR-ABL* positivas, como en LLA-B *BCR-ABL* negativas.

Leucemia mieloblástica aguda no M3

La leucemia mieloblástica aguda es un grupo heterogéneo de hemopatías que constituye la forma más frecuente de leucemia aguda en adultos y hasta el 30% de las leucemias pediátricas. La identificación de diversas aberraciones cromosómicas permite establecer subgrupos dentro de la LMA, los cuales en su mayoría se asocian a un pronóstico favorable, como la t(15;17) en LMA-M3, la t(8;21) en LMA-M2 y la inv16 en LMA-M4eo. Sin embargo, en cerca del 40-50% de los pacientes LMA no M3 se observa un cariotipo normal, lo que hace necesario la búsqueda de nuevos marcadores para el diagnóstico y seguimiento de EMR. Existe amplia literatura que presenta diversos marcadores específicos de células tumorales y que pueden ser detectados y cuantificados por métodos moleculares. Para citar algunos ejemplos se puede mencionar la nucleofosmina (*NPM1*), una chaperona molecular que participa en la regulación de la vía supresora de tumores de p53 y que está mutada en un 35% de LMA de adultos y 7% de LMA pediátricas; la mutación en la tirosina quinasa *FLT3*; la sobreexpresión del gen *PRAME* en un 62% de LMA de adultos y 64% en niños; y del gen del tumor de Wilms (*WT1*) en un 67% en LMA de adultos (sus implicaciones pronósticas en niños aún se encuentran en debate).

Leucemia promielocítica aguda

La leucemia promielocítica aguda (LPA) constituye aproximadamente un 15% de todas los casos de leucemias mieloides aguda (LMA), con una mayor incidencia (20-30%) en los países mediterráneos y en América Latina. La LPA se caracteriza por un predominio de promielocitos malignos que muestran una translocación recíproca entre los brazos largos de los cromosomas 15 y 17, t(15;17)(q22;q11.2-q12). De esta manera, se forma un gen híbrido *PML-RARα*, que está presente en el 92-95% de los casos de LPA, y su recíproco, *RARα-PML*, que se presenta en el 60% de los casos. Su detección se ha vuelto indispensable para el diagnóstico de LPA, además de ser un excelente marcador para EMR, cuya evaluación se recomienda hacer al final de los ciclos de quimioterapia de consolidación y luego cada cuatro meses hasta el final de tratamiento.

Leucemia mieloide crónica

La leucemia mieloide crónica (LMC) se caracteriza por la presencia del gen de fusión BCR-ABL o cromosoma Philadelphia (Ph+), producto de las translocación t(9;22)(q34;q11). Dos productos principales pueden ser encontrados: la variante de 210 kDa (p210 o BCR-ABL mayor) detectada en más del 90% de las LMC Ph+,

y la variante de 190 kDa (p190 o BCR-ABL minor). La proteína híbrida resultante tiene una elevada actividad tirosina quinasa (TK), lo que incide directamente en la patogenia de la LMC. Esto motivó al surgimiento de una serie de tratamientos que pretendían inhibir la actividad TK, entre ellos el mesilato de imatinib (Glivec, STI570), un antagonista que compite con el ATP por los sitios de fosforilación en la proteína híbrida.

El tratamiento de las hemopatías malignas Ph+ han mejorado de forma notable a partir del advenimiento del Glivec, obteniendo niveles de remisión completa por encima del 80%. El estudio multicéntrico IRIS (*International Randomized Study of Interferon and STI-570*) demostró una eficacia muy superior del Glivec respecto a IFN, logrando respuesta hematológica completa (RHC) (leucocitos < 10.000/uL, plaquetas < 45.0000/uL, sin esplenomegalia, < 5% basófilos y sin granulocitos inmaduros en SP) de 95% vs 55%, y respuestas citogenéticas completas (RCyC) (metafases Ph+ 0%) de 76% vs 15%.

Sin embargo, para un correcto uso del imatinib, es necesario un estricto control del Ph+, por medio de técnicas altamente sensibles y específicas, además del estudio periódico del cariotipo, en busca de otras alteraciones cromosómicas, relacionadas a peor pronóstico. El seguimiento debe ser mediante PCR cuantitativo en tiempo real (RQ-PCR), con el fin de detectar posibles fallas del tratamiento o respuestas subóptimas que impliquen cambios en el esquema terapéutico o el análisis de mutaciones resistentes al Glivec.

El *LeukemiaNet*, que agrupa a un importante número de laboratorios de Europa, Australia y EEUU, propuso en el año 2006 una serie de parámetros para el adecuado seguimiento de los pacientes con LMC Ph+, definiendo una buena respuesta al imatinib cuando el paciente alcanza la respuesta hematológica completa (RHC) a los tres meses posterior al inicio del tratamiento, la respuesta citogenética parcial (RCyP) (< 35% de metafases Ph+ por FISH o cariotipo) a los seis meses, la respuesta citogenética completa (RCyC) a los 12 meses, y la respuesta molecular mayor (RMoM) (reducción de tres logaritmos en el número de copias de BCR-ABL respecto al diagnóstico) a los 18 meses. En caso contrario, según el *LeukemiaNet*, se debe evaluar si se trata de una respuesta subóptima (que se puede revertir con un aumento de dosis de Glivec de 400mg/día a 600 mg/día) o fallo de tratamiento (el cual debe ser tratado con inhibidores de segunda -desatinib nilotinib- o tercera generación -bosutinib, ponatinib-, o bien, quimioterapia+ trasplante de células progenitoras hematopoyéticas).

No obstante, en la más reciente revisión de los criterios de respuesta a los inhibidores de tirosina quinasas (publicado por los mismos autores en el año 2013), se eliminó el criterio de respuesta subóptima y se establecieron unos criterios más estrictos para definir respuesta óptima: a los tres meses una reducción de al menos un logaritmo ($\leq 10\%$) de *BCR-ABL* y/o RCyP; a los seis meses una reducción de al menos dos logaritmos ($\leq 1\%$) de *BCR-ABL* y/o RCyC; y a los 12 meses una reducción de al menos tres logaritmos ($\leq 0,1\%$) de *BCR-ABL*. Por el contrario, se considera fallo a tratamiento si a los tres meses no hay RHC; si a los seis meses se observa $> 10\%$ de *BCR-ABL*; si a los 12 meses se observa $> 1\%$ de *BCR-ABL*; o bien, si en cualquier momento se confirma pérdida de respuesta molecular (dos muestras consecutivas con resultados de PCR positivos) o la aparición de mutaciones en el gen *ABL*.

TROMBOFILIAS

Factor V Leiden

La proteína C, junto a su cofactor la proteína S, forma parte del sistema de control de la coagulación, ya que inactivan a los factores Va y VIIIa. Esta inactivación se logra al cortar estos factores en ciertos puntos específicos. En el caso del factor V, la proteína C realiza el corte en tres sitios donde se encuentra una arginina: R306, R506 y R679. La mutación que se presenta en el factor V Leiden involucra el cambio de una guanina por una adenina en la posición 1691 (G1691A), lo cual provoca la sustitución de la arginina en la posición 506, por una glutamina (R506Q). Este cambio conlleva a la ausencia de reconocimiento de la proteína C en este sitio de corte, evitando la correcta inactivación del factor Va y su consecuente aumento en circulación.

El factor V Leiden constituye la causa de trombosis venosa de origen hereditario más común. Puede presentarse de forma heterocigota, como se encuentra en la población caucásica (5%), hispánica (2,2%) y afroamericana en los Estados Unidos (1,2%). La forma homocigota es menos frecuente, siendo encontrada en uno de cada 5.000 individuos en toda la población. El riesgo de un evento trombótico aumenta en un factor de siete en los casos heterocigotos, en comparación con el aumento de 80 veces en los casos homocigotos.

Factor II G20210A

El gen de la protrombina o factor II de la coagulación está compuesto por 14 exones y se encuentra codificado en el cromosoma 11. Se ha identificado una mutación en la región no codificante 3' de este gen,

donde una guanina es sustituida por una adenina en la posición 20210 (G20210A). Como consecuencia, se observa un aumento en la eficiencia de la señal de corte en el extremo 3' y/o aumento en la eficiencia de la traducción, causando ambas una mayor producción del factor II. Este tipo de mutación se le llama "ganancia de función".

El exceso de protrombina en circulación aumenta el riesgo de una trombosis venosa. En los pacientes heterocigotos se ha observado un incremento de tres veces el riesgo en comparación con aquellos homocigotos para el gen salvaje. En Estados Unidos se calcula que el 2% de la población posee la mutación.

Las pruebas moleculares son necesarias en este caso, ya que los valores de referencia para la protrombina en circulación son muy amplios, brindando poca información cuando la expresión se encuentra aumentada debido a la mutación.

MTHFR C677T y A1298C

La enzima metil tetrahidrofolato reductasa (MTHFR) posee la función de transformar el 5,10-metilen tetrahidrofolato a 5-metil tetrahidrofolato; este último es un importante cosustrato de la enzima metionina sintetasa, encargada de la transformación de la homocisteína en metionina. Si la enzima MTHFR fallara, existiría una acumulación de homocisteína, lo cual está asociado con mayor riesgo de enfermedades cardiovasculares y trombosis.

Se han encontrado dos mutaciones en el gen que codifica por esta enzima: una sustitución de una citosina por una timina en la posición 677 (C677T), causando el cambio de una alanina por una valina, lo que crea una variante de la enzima que es termolábil y por lo tanto, inefectiva; y el cambio de una adenina por una citosina en la posición 1298 (A1298C), llevando a que una glutamina sea remplazada por alanina, lo cual afecta la especificidad de unión de MTHFR. Existe controversia acerca de la asociación de estas mutaciones con un riesgo más alto de enfermedades coronarias y/o trombosis venosa. Los pacientes en los que se ha encontrado mayor relación entre la mutación C677T y la trombosis son los que poseen además una deficiencia de ácido fólico. En donde se ha hallado heterocigocidad para ambas mutaciones (doble heterocigota), sí se ha demostrado un mayor riesgo de presentar una trombosis, en comparación con los casos heterocigotos de cada mutación.

Aunque la mutación homocigota de este gen (ya sea C677T o A1298C) se ha asociado a mayor pérdida gestacional y otros problemas trombóticos, este

marcador no debe interpretarse en forma aislada como un factor pronóstico de enfermedad coronaria o trombótica, sino en conjunto con otras pruebas de coagulación plasmáticas y moleculares.

BIBLIOGRAFÍA

Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, Hochhaus A, Soverini S, Apperley JF, *et al.* European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood* 2013; 122(6): 872-884.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162(1): 156-159.

Gabert J, Beillard E, van der Velden VH, Bi W, Grimwade D, Pallisgaard N, *et al.* Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program. *Leukemia* 2003; 17(12): 2318-2357.

González M, García-Sanz R, González-Sarmiento R. Biología molecular en las enfermedades hematológicas. En: García-Conde J, San Miguel JF, Sierra J, Urbano-Ispizua V, Vives Corrons JL (editores). *Hematología*. Madrid: Editorial Arán; 2003. p. 69-83.

Kantarjian H, Sawyers C, Hochhaus A, Guilhot F, Schiffer C, Gambacorti-Passerini C, *et al.* Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med* 2002; 346: 645-652.

Khor B, Van Cott E. Laboratory evaluation of hypercoagulability. *Clin Lab Med* 2009; 29(2): 339-366.

Mullighan CG. The molecular genetic makeup of acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2012; 2012: 389-396.

Saiki R, Scharf S, Faloona F, Mullis K, Horn G, Erlich H, *et al.* Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230(4732): 1350-1354.

Santamaría C, Vargas M, Venegas P, Calvo M, Obando C, Valverde B, *et al.* Molecular and epidemiologic findings of childhood acute leukemia in Costa Rica. *J Pediatr Hematol Oncol* 2009; 31(2): 131-135.

Santamaría CM, Chillón MC, García-Sanz R, Pérez C, Caballero MD, Ramos F, *et al.* Molecular stratification model for prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Blood* 2009; 114(1): 148-152.

van Dongen JJ, Langerak AW, Brüggemann M, Evans PA, Hummel M, Lavender FL, *et al.* Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2

Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 2003; 17(12): 2257-2317.

Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, *et al.* The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 2009; 114(5): 937-951.

*Dr. Rafael Jiménez Bonilla
Dr. Jorge López Villegas*

GENERALIDADES

El balance entre las fuerzas de la hemostasia es necesario para mantener la sangre líquida dentro de los vasos sanguíneos y para evitar que esta se escape en caso de una herida o de un daño vascular. Para que la hemostasia se lleve a cabo, es importante que exista una perfecta interacción entre la pared de los vasos sanguíneos, las plaquetas circulantes y los factores de la coagulación sanguínea, que son proteínas inactivas dentro del torrente circulatorio.

Un mecanismo que repare de manera rápida el daño vascular es esencial para que los seres humanos podamos sobrevivir a una herida, pero la respuesta debe ser controlada, para que la sangre no se siga coagulando completamente y para que el coágulo formado se deshaga posteriormente. Por lo tanto, la hemostasia comprende una serie de mecanismos procoagulantes y anticoagulantes, así como de agregación y de antiagregación de las plaquetas, muchos de los cuales son realizados por el endotelio vascular. De tal forma, se observa que los tres componentes citados al inicio (vasos, plaquetas y factores de la coagulación), clásicos desde el tiempo de Virchow (finales del siglo XIX), se han aumentado a cinco, al incluirse los inhibidores de la coagulación sanguínea y el sistema de la fibrinólisis.

VASOS SANGUÍNEOS

Las células endoteliales juegan un papel preponderante para mantener la integridad de los vasos sanguíneos, porque proveen una capa interna formada por colágeno, elastina y fibronectina, y porque producen sustancias con efectos antiagregantes y proagregantes de las plaquetas, así como con acción de procoagulantes y de anticoagulantes de la coagulación sanguínea. De esta manera, el endotelio no solo tiene importancia para mantener la sangre líquida y para cerrar una herida, sino que constituye una parte fundamental en el proceso trombótico arterial y en la enfermedad aterosclerótica, problemas que representan una de las principales causas de mortalidad en los adultos.

Un proceso relevante tanto para la génesis de trombosis, como para la detención de una hemorragia,

es el poder de expansión de los vasos sanguíneos. Por medio de la vasoconstricción se ayuda a detener la salida de sangre, y por medio de la vasodilatación se puede resolver un fenómeno vaso-oclusivo.

Para citar algunos ejemplos, se puede decir que las células endoteliales producen el inhibidor del factor tisular (tFPI), el activador del plasminógeno (tPA), el factor tisular (FT), el factor von Willebrand (FvW), la prostaciclina, la antitrombina, la trombomodulina, y sustancias semejantes a la heparina, como el sulfato de heparán, cuyas actividades son a veces antagonistas; todas de gran relevancia en la hemostasia.

PLAQUETAS

Las plaquetas son corpúsculos anucleados pequeños, los cuales, a pesar de su tamaño (3-4 micras), presentan una gran complejidad interna y cumplen un rol vital en la hemostasia. Estas células son las encargadas de generar un tapón primario ante un daño vascular y facilitan la acción de los factores de la coagulación, que producen el coágulo estable de fibrina. Además de su función principal, las plaquetas también proveen una superficie de fosfolípidos necesaria para la activación de los factores de la coagulación, liberan sustancias que regulan procesos hemostáticos e inflamatorios, y participan en la retracción del coágulo.

Estructura plaquetaria

Las plaquetas son producidas en la médula ósea a partir de los megacariocitos, mediante la fragmentación de su citoplasma, por lo que carecen de núcleo. Son corpúsculos pequeños con forma discoide, de aproximadamente 3 µm de diámetro, con un volumen promedio de 7-11 fentolitros. Cuentan con un esqueleto basado en espectrina, que soporta la membrana fosfolípida de manera similar a como ocurre en el eritrocito; además, poseen una red de filamentos de actina que se extienden por el citosol y que son vitales para cumplir su función de tapón hemostático.

Las plaquetas presentan dos estructuras principales de almacenamiento: gránulos densos (o gránulos δ) y gránulos alfa. Una plaqueta promedio contiene de seis a nueve gránulos densos y de 70 a 90 gránulos

alfa. Los gránulos densos almacenan nucleótidos de adenina (ADP y ATP) y altas concentraciones de calcio y serotonina necesarios para el proceso de agregación plaquetaria y vasoconstricción. Por otra parte, los gránulos alfa contienen sustancias que regulan la hemostasia y los procesos inflamatorios, tales como el factor von Willebrand, los factores V y VIII, el factor de crecimiento derivado de plaquetas, la alfa 2-antiplasmina, entre otras.

Las vías de señalización intracelular presentes en las plaquetas son numerosas, con una gran cantidad de receptores en su membrana, los cuales, ante el estímulo de sustancias agonistas (ADP, colágeno y tromboxano), le permiten activarse y responder de forma inmediata al daño vascular. Además, poseen en su superficie diversas glicoproteínas (GP) que median la adhesión al subendotelio y la agregación de las plaquetas entre sí (agregación plaquetaria).

Proceso de formación del tapón plaquetario

- **Adhesión:** al producirse un daño en el endotelio se exponen componentes subendoteliales (por ejemplo, colágeno o factor von Willebrand), a los cuales se van a unir las plaquetas circulantes mediante sus glicoproteínas de membrana. En este primer paso de adhesión, es vital el complejo de glicoproteínas GP Ib/IX/V, que es el primero en adherirse al factor von Willebrand del subendotelio. Posteriormente, otras glicoproteínas interactúan con el subendotelio, anclando la plaqueta e iniciando su activación. Durante esta activación, la plaqueta cambia su forma de discoide a esférica, y extiende su citoplasma en forma de pseudópodos, lo que le permite interactuar mejor con otras plaquetas y con el endotelio dañado.
- **Agregación:** luego de darse la activación de la plaqueta, la GP IIb/IIIa pasa de estar en un estado de reposo a un estado activo, en donde puede unirse al fibrinógeno o al factor von Willebrand, y

hacer puentes con otras plaquetas circulantes, reclutando mayor cantidad de plaquetas en el sitio de daño vascular. Este proceso de unión de plaquetas activadas se conoce como *agregación plaquetaria*.

- **Secreción:** por último, los contenidos de los gránulos densos y los gránulos alfa son liberados por la plaqueta, lo que promueve el reclutamiento y la activación de otras plaquetas. Dentro de las sustancias secretadas se encuentra el tromboxano A₂, uno de los principales agonistas plaquetarios, el cual es producido por la plaqueta gracias a la enzima COX-1, a partir del ácido araquidónico. Además, la membrana plaquetaria sufre un rearrreglo y expone fosfolípidos cargados negativamente, que sirven de superficie para que se inicie el proceso de coagulación mediado por factores.

Posteriormente, las plaquetas participan también en el proceso de retracción del coágulo. Una vez desarrollado el trombo, este es estabilizado y fijado a la superficie dañada, por medio del citoesqueleto de las plaquetas, evitando que sea acarreado por el flujo sanguíneo y forme émbolos a la distancia.

CASCADA DE LA COAGULACIÓN

La coagulación sanguínea, al igual que cualquier cascada, comienza en pequeña escala con la activación de pocas moléculas, y su acción va incrementándose hasta formar un torrente que llega a constituir un tapón hemostático de fibrina, una verdadera malla que atrapa la sangre para que no escape de los vasos. De esta manera, el débil tapón plaquetario inicial se transforma rápidamente en un coágulo firme, definitivo y estable.

Para llegar a esa situación, la coagulación pasa por diferentes etapas, en las que se activan una serie de proteínas inactivas que circulan por la sangre (Cuadro N° 1).

Cuadro N° 1. Los factores de la coagulación		
Factores	Nombre	Forma activa
I	Fibrinógeno	Subunidad de fibrina
II	Protrombina	Proteasa de serina
III	Factor tisular	Receptor/cofactor*
V	Factor lábil	Cofactor
VII	Proconvertina	Proteasa de serina

Cuadro N° 1. Los factores de la coagulación		
Factores	Nombre	Forma activa
VIII	Factor antihemofílico	Cofactor
IX	Factor Christmas	Proteasa de serina
X	Factor Stuart-Prower	Proteasa de serina
XI	Antecedente tromboplastínico del plasma	Proteasa de serina
XII	Factor Hageman (factor de contacto)	Proteasa de serina
XIII	Factor estabilizante de la fibrina Precalicroína (factor Fletcher) Factor Fitzgerald (HMWK)	Transglutaminasa Proteasa de serina Cofactor

HMWK: quininógeno de alto peso molecular.

* Activo sin necesidad de que haya proteólisis.

La generación de trombina *in vivo* es un mecanismo complejo que se amplifica y que tiene diferentes puntos de retroalimentación, así como varios inhibidores.

Lo primero que ocurre cuando se produce un daño vascular, es que rápidamente el factor tisular (formado por los lípidos liberados por el traumatismo o por la lesión) crea un complejo con el factor VII. Esto hace que el F VII se convierta en el F VIIa (factor siete activado, que es una enzima con actividad de proteasa de serina), que transforma el factor X en Xa (en presencia del factor Va que acelera la reacción).

El factor Xa es otra enzima muy activa, con actividad de proteasa de serina (como el factor VIIa), que convierte la protrombina (factor II) en TROMBINA. Lo importante es que en el momento en que se produce trombina dentro del torrente circulatorio, hay coagulación intravascular, porque la trombina es una enzima potentísima que convierte el fibrinógeno (factor I) en fibrina, la cual formará la malla del tapón hemostático.

Por otra parte, de manera más lenta, pero consistente, el factor XI (después de activarse) activa a su vez al factor IX, el cual -al mismo tiempo- es activado por el complejo FVIIa/FT.

El IXa consigue establecer un complejo con el VIIIa, el calcio y los fosfolípidos, y así, todos juntos, consiguen transformar el factor X en Xa. El FXa, junto con el factor Va, el calcio y los fosfolípidos, convierten la protrombina en trombina, la cual, como se mencionó, transforma el fibrinógeno en fibrina.

Por lo tanto, el tapón hemostático puede formarse por dos caminos: uno rápido (FT/VIIa), que se

denomina *vía extrínseca* por tener liberación del factor tisular; y otro, a través de la activación del XI y que posteriormente involucrará al IX, al VIII y al V, denominado *vía intrínseca*. La vía que involucra al X, V, II y I se denomina *vía común* (Figura N° 1, Cuadro N° 2).

Como se mencionó, las dos vías interaccionan entre sí, ya que el complejo FT/VII actúa sobre el Xa y también sobre el IX. La vía extrínseca produce rápidamente trombina y la vía intrínseca llega a lo mismo, pero en cantidades mucho mayores.

Un aspecto importante a considerar es que la formación de los complejos (IXa-VIIIa-calcio-fosfolípidos y Xa-Va-calcio-fosfolípidos) tiene la función de acelerar las reacciones; es decir, que si los complejos no se produjeran, las reacciones serían más lentas y menos efectivas.

Un factor que no se ha mencionado es el XIII, cuya acción es estabilizar la fibrina. En los casos en que el factor XIII no esté presente, los pacientes sangrarán un tiempo después de los traumatismos, porque la hemostasia fallará cuando la fibrina no se consolide; por lo general, son unas horas después de que la hemorragia aparentemente se detuvo.

El mecanismo de la coagulación sanguínea explica por qué sangra un paciente cuando no tiene un determinado factor y por qué las hemofilias A y B (deficiencia de factor VIII y IX, respectivamente) son más severas que otras deficiencias de factores. Asimismo, explica las pruebas de laboratorio como el tiempo de protrombina (TP) y el tiempo de tromboplastina parcial (TTP).

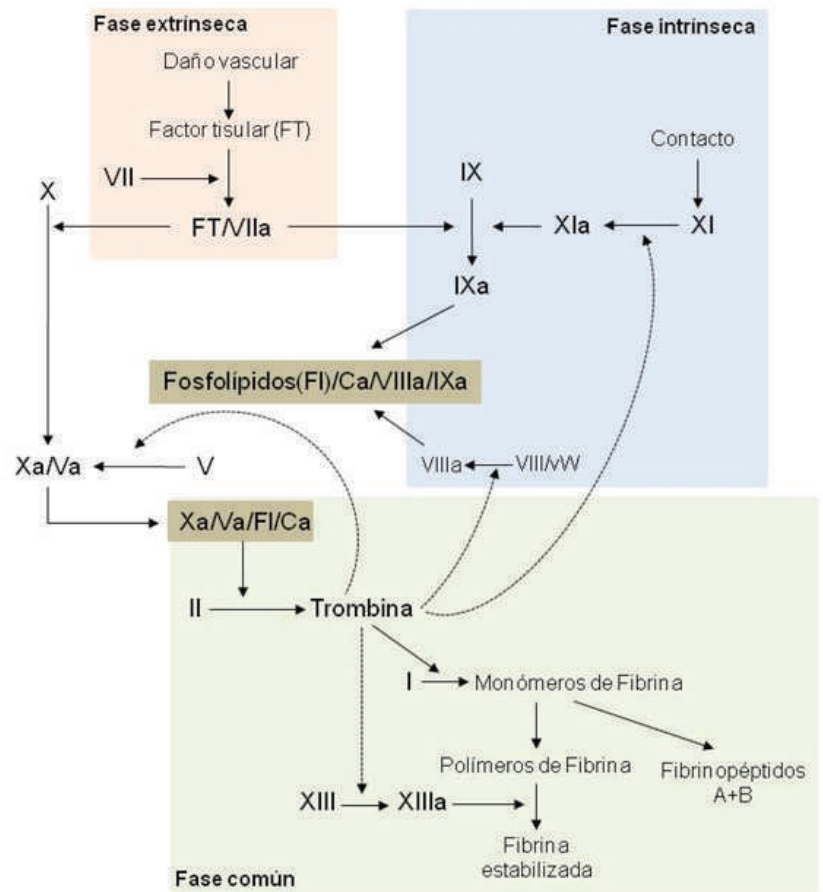


Figura N° 1. Secuencia de activación e interacciones por las vías intrínseca y extrínseca. La comprensión de este mecanismo permite entender las pruebas de laboratorio, la etiología de las trombosis y los problemas de sangrado. Recordar que el mecanismo de la coagulación inicia en la superficie celular por medio del factor tisular (FT).

Cuadro N° 2. Función de algunas proteínas del endotelio y del subendotelio	
Proteína	Función
Trombomodulina	Cofactor de la proteína C.
Factor von Willebrand	Permite la adhesión de las plaquetas.
	Transporta el factor VIII.
Factor tisular	Inicia la coagulación.
Prostaciclina	Causa vasodilatación.
	Inhibe la agregación plaquetaria.
Antitrombina	Inhibe la trombina y el FXa.
	Cofactor de la heparina.
Inhibidor del FT	Inhibe el factor tisular.
Proteína S	Activa la proteína C.
tPA	Activa el plasminógeno.

El TP evalúa los factores VII, X, V, II y I, y si alguno de ellos estuviera ausente o disminuido, la prueba daría muy prolongada. Esto podría deberse a deficiencia hereditaria, a la presencia de anticoagulantes orales o a la mala producción hepática de algunos de esos factores, lo que da origen a mutaciones, las cuales muchas veces son proteínas funcionalmente inactivas.

El TTP, por su parte, mide los factores XII, XI, IX, VIII,

X, V, II y I. Esta prueba sirve para evaluar las hemofilias A y B.

Si ambas pruebas estuviesen alteradas, es posible que hubiera alteración de los factores comunes para ambas vías: X, V, II y I.

En el Cuadro N° 3 se presenta el modo de acción de los diferentes factores y proteínas de la coagulación sanguínea.

Cuadro N° 3. Acción de diferentes factores y proteínas	
Factor	Función
Factor I	Se transforma en fibrina.
Factor II	Se transforma en trombina.
Trombina	Convierte el fibrinógeno en fibrina.
	Destruye los factores Va y VIIIa.
Factor VIII	Su deficiencia causa hemofilia A.
	Es transportado por el FvW.
	Es destruido por la PCa.
Factor IX	Su deficiencia produce hemofilia B.
Factor X	Convierte la protrombina en trombina.
Factor XIII	Estabiliza la fibrina.

INHIBIDORES DE LA COAGULACIÓN

El principal inhibidor de la coagulación sanguínea es la antitrombina. Tal como su nombre lo indica, esta proteína neutraliza la acción de la trombina, dado que nuestro organismo no puede darse el lujo de producir la más mínima traza de trombina, porque ello haría que la sangre coagulara. Por lo tanto, es imprescindible que exista un control que regule la formación de trombina. Al mismo tiempo, como la producción del factor Xa se realiza por medio de las dos vías citadas, y como el factor Xa convierte por sí solo la protrombina en trombina, la antitrombina también neutraliza al factor Xa, para que no haya ninguna posibilidad de que se llegue a formar trombina en exceso.

La antitrombina es el cofactor de la heparina, y para que este anticoagulante actúe de manera apropiada en nuestro organismo, es necesario que exista una cantidad normal de antitrombina. En los pacientes con deficiencia de antitrombina pueden presentarse fenómenos trombóticos de tipo venoso (debido a que la trombina se formará más fácilmente), porque la coagulación sanguínea seguirá activa y no se detendrá. También se observa que si esos pacientes reciben

heparina para anticoagularlos, la dosis requerida será mayor que la suministrada a un paciente que tuviera la antitrombina en cantidades normales.

La coagulación sanguínea es muy compleja y tiene un proceso de retroalimentación basado en que al formarse la trombina esta activa posteriormente a los factores V y VIII, para que sigan activándose, haciendo así que la coagulación se perpetúe. Esto se consigue a través del mecanismo de la proteína C, la cual, en presencia de trombomodulina, activa esos factores para que el mecanismo de la coagulación siga produciendo trombina.

Otro inhibidor es la proteína S, que sirve como cofactor de la proteína C. Ambas proteínas son dependientes de la vitamina K.

FIBRINÓLISIS

Este proceso es normal e indispensable para que se eliminen los coágulos formados al producirse heridas, una vez que la función de detener la salida de la sangre ha terminado. La fibrinólisis es necesaria para remover la fibrina depositada en cavidades serosas y

en los tejidos del cuerpo, así como para proteger al organismo de una formación excesiva de fibrina, y se realiza por un sistema enzimático proteolítico llamado plasminógeno-plasmina. Además, posee varios activadores e inhibidores.

A pesar de que el sistema de coagulación y el fibrinolítico son antagonistas, hay una similitud entre ambos. En los dos, una enzima proteolítica que circula de manera inactiva es activada y actuará sobre otra proteína inactiva.

El plasminógeno (PM de 68.000 daltons) es una beta globulina que circula normalmente en la coagulación sanguínea como una proenzima, y debido a una serie de activadores llegará a convertirse en una forma activa denominada plasmina. Solo una parte del plasminógeno será capaz de llegar a unirse a la fibrina para lisar el coágulo o el trombo; el resto seguirá circulando como un complejo con la glicoproteína llamada *rica en histidina*.

Diversos activadores, exógenos y endógenos, activarán el plasminógeno para que llegue a transformarse en plasmina, la cual es una enzima proteolítica muy activa. Esta reacción es irreversible. Por lo general, la plasmina actúa no solo sobre la fibrina, su principal sustrato, sino también sobre los factores V, VII, VIII y sobre varias hormonas.

Debido a la acción de la plasmina sobre el fibrinógeno-fibrina, se produce el dímero D y se liberan los productos de degradación del fibrinógeno-fibrina (PDF), que son muy importantes para demostrar que el proceso de la coagulación fue activado y que por esa razón se activó el proceso de fibrinólisis.

El primer PDF que se produce es un fragmento grande llamado fragmento X, el cual tiene un PM de 250.000 daltons, y todavía puede coagular; es decir, que compite con el fibrinógeno por la trombina. El fragmento X es degradado a otros fragmentos más pequeños por la acción de más plasmina. El fragmento Y tiene un PM de 150.000 daltons, el D tiene un PM de 100.000 daltons y el E un PM de 50.000 daltons. Todos estos fragmentos comparten con el fibrinógeno propiedades inmunológicas, que sirven para detectarlos en el laboratorio. Los PDF de la fibrina son semejantes y tienen la misma nomenclatura. Grandes cantidades de los fragmentos más pequeños (D y E) se detectan en los pacientes con coagulación intravascular diseminada (CID).

Los activadores del plasminógeno se dividen -como ya se dijo- en endógenos y exógenos. Los primeros están presentes en la sangre y en otros fluidos del

organismo, y los segundos se encuentran en bacterias como los estreptococos beta hemolíticos, de los cuales la estreptoquinasa es el más conocido y, además, utilizado en la terapia trombolítica.

Entre los activadores endógenos se encuentran la uroquinasa, producida en el riñón y presente en la orina, y el activador tisular del plasminógeno (tPA), que es el más conocido de todos.

El tPA es una glicoproteína de cadena simple que posee 527 aminoácidos y que tiene un PM de 70.000 daltons. Es una proteasa de serina producida por las células endoteliales (otra función del endotelio vascular). Su vida media es de 2,5 minutos y es rápidamente aclarada por el hígado. La presencia de fibrina aumenta de manera notable el porcentaje de activación del tPA, y lo bueno es que este convierte en plasmina al plasminógeno que haya quedado en el coágulo. El tPA se libera después de un trauma, de ejercicio o de estrés emocional.

En la actualidad, el tPA se prepara en forma recombinante usando tecnología de ADN, y de esta manera se utiliza en la terapia trombolítica sin la preocupación de inyectar productos contaminados con virus; sin embargo, su precio es muy elevado.

Dentro de los inhibidores del sistema fibrinolítico se encuentran las antiplasminas y los inactivadores del tPA, conocidos como inhibidores del activador tisular del plasminógeno (PAI). Las antiplasminas son glicoproteínas de PM cercanas a los 70.000 daltons, que se sintetizan en el hígado. La alfa 2 antiplasmina se une al plasminógeno y neutraliza su acción en un 70%. El resto de las antiplasminas no se unen al plasminógeno y su acción para neutralizar la plasmina es más lenta. La deficiencia congénita de alfa 2 antiplasmina en su carácter homocigoto presenta una severa enfermedad hemorrágica. La segunda antiplasmina en importancia es la alfa 2 macroglobulina; su deficiencia hereditaria es asintomática.

En cuanto a los inactivadores del tPA, el principal inhibidor se denomina PAI 1 y es de tipo endotelial; mientras que el PAI 2, otro inhibidor, es de tipo placentario. En algunos pacientes con enfermedad coronaria, en ancianos y obesos, y posterior a cirugías, se ha encontrado aumento del PAI 1, lo que se traduce en una respuesta fibrinolítica deficiente, porque al no activarse el plasminógeno, existe poca plasmina.

Es importante hacer notar que el factor XII de la coagulación sanguínea, cuya deficiencia presenta un TTP prolongado, no muestra una diátesis hemorrágica como la mayoría de los otros factores de la coagulación,

sino que su papel está más relacionado como mediador de la caliceína y posterior activador del plasminógeno, y por lo tanto, tiene una acción sobre la fibrinólisis.

En la Figura N° 2 se muestra la forma de acción del mecanismo de fibrinólisis.

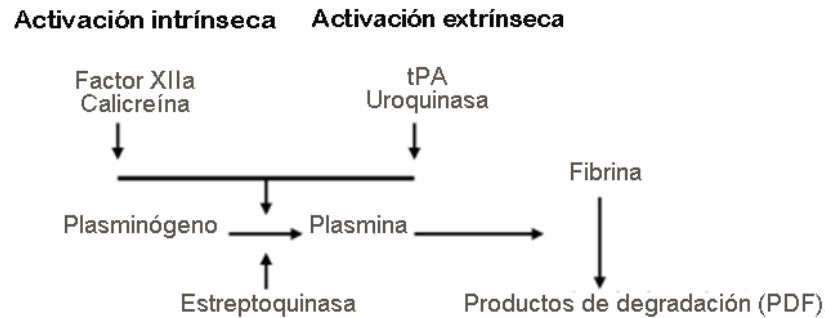


Figura N° 2. Análisis de los mecanismos de activación del plasminógeno y la forma en que actúa la plasmina sobre la fibrina.

Por último y a modo de resumen, es necesario hacer notar que la vasoconstricción, la acción de las plaquetas y de los factores de la coagulación sanguínea, la estabilización de la fibrina, el papel de la fibrinólisis y de los inhibidores, tanto del mecanismo de la coagulación sanguínea como del sistema fibrinolítico, forman una unidad responsable de que la sangre se mantenga líquida y no coagule.

PUNTOS SOBRESALIENTES EN EL TEMA DE LA HEMOSTASIA

- Las plaquetas son partículas anucleadas pequeñas, pero de gran complejidad interna y con múltiples funciones.
- Las plaquetas son las encargadas de generar un tapón hemostático primario ante cualquier daño vascular.
- Existen dos tipos de gránulos plaquetarios (alfa y densos), los cuales contienen sustancias clave para procesos hemostáticos e inflamatorios.
- El proceso de formación del tapón hemostático primario involucra adhesión, agregación y secreción plaquetaria, mediante la interacción de diversas glicoproteínas de membrana.

BIBLIOGRAFÍA

Aird WC. Endothelial cell heterogeneity. *Crit Care Med* 2003; 31(4 suppl.): S221-S230.

Bennett JS, Berger BW, Billings PC. The structure and function of platelet integrins. *J Thromb Haemost* 2009; 7(Suppl 1): 200-205.

Dahlbäck B, Villoutreix BO. Molecular recognition in the protein C anticoagulant pathway. *J Thromb Haemost* 2003; 1(7): 1525-1534.

Enciclopedia Iberoamericana de Hematología. España: Ediciones Universidad de Salamanca; 1992.

George JN. Platelets. *Lancet* 2000; 355(9214): 1531-1539.

Hoffbrand AV, Moss PAH, Pettit JE. *Essential haematology*. 5 ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 2006.

Italiano JR, Shivdasani RA. Megakaryocytes and beyond: the birth of platelets. *J Thromb Haemost* 2003; 1(6): 174-182.

Kemball-Cook G, Tuddenham EGD, McVey JH. Normal haemostasis. En: Hoffbrand AV, Catovsky D, Tuddenham E (editores). *Postgraduate haematology*. 5 ed. London: Blackwell; 2005.

Lee R, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer J, Rodgers G. *Wintrobe's clinical hematology*. 10 ed. Baltimore: Williams and Wilkins; 1998.

Martínez-Murillo C, Quintana-González S. *Manual de hemostasia y trombosis*. México, D.F.: Editorial Prado; 1996.

Prevost N, Woulfe D, Tognolini M, Brass LF. Contact-dependent signaling during the late events of platelet activation. *J Thromb Haemost* 2003; 1(7): 1613-1627.

Watson SP, Harrison P. The vascular function of platelets. En: Hoffbrand AV, Catovsky D, Tuddenham E (editores). *Postgraduate haematology*. 5 ed. London: Blackwell; 2005.

Dr. Rafael Jiménez Bonilla
Dr. Jorge López Villegas
Dra. Lidiette Salazar Palma

GENERALIDADES

El sangrado anormal en una persona puede producirse por desórdenes vasculares, trombocitopenia, disfunción de plaquetas o por defectos en los factores de la coagulación. El sitio de sangrado es relativamente previsible según el tipo de desorden involucrado. De

esta forma, los defectos vasculares y plaquetarios (ya sea por disminución o mal funcionamiento de las plaquetas) suelen asociarse a sangrado en mucosas y en piel, mientras que los desórdenes de factores de la coagulación se relacionan con sangrado en articulaciones y tejidos blandos (Cuadro N° 1).

Cuadro N° 1. Alteraciones de la coagulación según su causa		
Hallazgos	Plaquetas/vasos	Coagulación
Sangrado en mucosas	Común	Raro
Petequias	Comunes	Raras
Hematomas profundos	Raros	Característicos
Sangrado en piel (cortadas)	Persistente	Mínimo
Sexo del paciente	Igual en ambos	80% en hombres

DESÓRDENES VASCULARES

Los desórdenes de los vasos sanguíneos, por lo general, no producen sangrado severo, y se presentan con petequias y equimosis, observándose algunas veces también en membranas. Las pruebas de escrutinio de coagulación (TP y TTP), así como el tiempo de sangrado (TS) son normales. Estos defectos pueden ser hereditarios o adquiridos.

Desórdenes vasculares hereditarios

- **Telangiectasia hemorrágica hereditaria:** es un defecto bastante común, transmitido en forma autosómica dominante. Presenta gran cantidad de microvasculatura con vasos dilatados y los pacientes tienen epistaxis y sangrado gastrointestinal.
- **Síndrome de Ehlers-Danlos:** este es un desorden del tejido conectivo, con anomalías en el colágeno y agregación plaquetaria deficiente.
- **Hemangioma gigante cavernoso:** estas malformaciones congénitas causan activación crónica de la coagulación sanguínea. Se manifiesta

con cuadros de laboratorio de coagulación intravascular diseminada (CID): trombocitopenia, TP y TTP prolongados, fibrinógeno bajo y productos de degradación de fibrinógeno elevados.

Defectos vasculares adquiridos

Estos se presentan en las piernas de mujeres sanas (pellizcos del diablo), en la púrpura senil y en asocio a ciertas infecciones. También en niños con el síndrome de Henoch-Schönlein, en el escorbuto y en los casos de pacientes que reciben esteroides por tiempo prolongado.

TROMBOCITOPENIA

Tanto en los pacientes con plaquetas bajas como en aquellos con disfunción plaquetaria, el sangrado se caracteriza por púrpura y por hemorragias en mucosas; por lo general, se observa sangrado después de golpes y traumatismos pequeños. Las causas pueden deberse a fallo en la producción plaquetaria, como en los casos de anemia aplásica o megaloblástica, leucemias e infecciones por VIH; problemas inmunológicos (púrpura trombocitopénica

inmunológica -PTI-); enfermedades autoinmunes o aloinmunes (púrpura feto-materna); administración

de heparina u otras drogas; infecciones; la CID o la púrpura trombótica trombocitopénica (Cuadro N° 2).

Cuadro N° 2. Causas de la trombocitopenia	
Producción alterada	- <i>Depresión selectiva de megacariocitos:</i> - Defectos congénitos raros. - Drogas, químicos, infecciones virales. - <i>Como parte de una falla medular:</i> - Radioterapia. - Anemia aplásica o megaloblástica. - Leucemia o infiltración tumoral (linfomas). - Síndromes mielodisplásicos o mielofibrosis. - Mieloma múltiple. - Infección por VIH.
Consumo aumentado de plaquetas	- <i>Inmune:</i> - Autoinmune. - Idiopática. - Asociada a lupus, leucemia linfocítica crónica o linfoma. - Infecciones (virus o malaria). - Inducida por drogas. - Heparina. - Púrpura post-transfusional. - Trombocitopenia aloinmune feto-materna. - <i>Coagulación intravascular diseminada.</i> - <i>Púrpura trombótica trombocitopénica.</i>
Distribución anormal de las plaquetas	- <i>Esplenomegalia.</i>
Pérdida por dilución	- <i>Transfusión masiva de sangre a pacientes que sangran.</i>

DESÓRDENES DE LA FUNCIÓN PLAQUETARIA

Estos desórdenes se sospechan en aquellas personas con sangrado en piel o mucosas sin alteraciones en las pruebas de coagulación (TP y TTP) y con recuento plaquetario normal. Estos trastornos pueden ser hereditarios o adquiridos.

Desórdenes hereditarios

Los defectos hereditarios en la función plaquetaria constituyen una causa importante de sangrado, con una prevalencia estimada de 1%, similar a la que se observa en la enfermedad de von Willebrand (coagulopatía hereditaria más frecuente). Los síntomas se manifiestan generalmente en edad pediátrica; sin embargo, el defecto puede pasar inadvertido y ser detectado por primera vez en edad adulta. La disfunción plaquetaria presente en las personas afectadas es producto de diversos mecanismos, que permiten clasificar estos desórdenes en cuatro grupos principales (Cuadro N° 3):

- **Defectos en los receptores plaquetarios para moléculas de adhesión:** las glicoproteínas plaquetarias presentan alteraciones cualitativas o cuantitativas que impiden su unión a proteínas involucradas en el proceso inicial de adhesión al endotelio y agregación, como son el factor von Willebrand, el fibrinógeno y el colágeno. Las deficiencias en estas glicoproteínas son relativamente poco frecuentes; pero se asocian a episodios de sangrado más severos (por ejemplo, hemorragia intracraneal), que pueden incluso llevar a la muerte en edades tempranas, por lo que el diagnóstico oportuno es clave.
- **Defectos en los receptores plaquetarios para agonistas solubles o en las vías de transducción de señales:** las plaquetas presentan anomalías en los receptores de membrana que interactúan con agonistas importantes o alteraciones en la cascada intracelular de señalización, que resultan en activación y agregación plaquetaria disminuidas. Dentro de las patologías mejor caracterizadas en este grupo se encuentran los defectos en el receptor

P2Y₁₂ para ADP, los defectos en el receptor para tromboxano A₂ y las deficiencias en la enzima ciclooxigenasa-1.

- **Defectos en los gránulos plaquetarios:** es un grupo heterogéneo de desórdenes que incluye deficiencias aisladas o combinadas en los gránulos δ y α . El más común de estos defectos es la enfermedad del *pool* de almacenamiento δ , término que engloba deficiencias congénitas, sindrómicas y no sindrómicas, en los gránulos densos. Otras condiciones menos comunes asociadas a alteraciones en los gránulos plaquetarios son el síndrome de las plaquetas grises (reducción o ausencia de gránulos α) y la enfermedad del *pool* de almacenamiento α - δ .

- **Defectos misceláneos:** en esta categoría se incluyen patologías que no han sido bien caracterizadas. Es importante destacar dentro de este grupo los defectos primarios de secreción (no asociados a ninguna de las deficiencias mencionadas anteriormente), los cuales constituyen una causa común de disfunción plaquetaria.

La frecuencia en la que se presentan estos grupos de anomalías es muy distinta, encontrando desde defectos raros como el síndrome de Bernard-Soulier (incidencia 1:1.000.000), hasta alteraciones más comunes como los defectos primarios de secreción (Cuadro N° 3).

Cuadro N° 3. Mecanismos de disfunción plaquetaria
Defecto en los receptores plaquetarios para moléculas de adhesión: <i>Síndrome de Bernard-Soulier.</i> <i>Trombastenia de Glanzmann.</i> <i>Enfermedad de von Willebrand de tipo plaquetario.</i> <i>Deficiencia de glicoproteína VI.</i> <i>Deficiencia de glicoproteína α2β1.</i>
Defecto en los receptores plaquetarios para agonistas solubles o en las vías de transducción de señales: <i>Defectos en receptor P2Y.</i> <i>Deficiencia de COX-1.</i> <i>Defectos en receptor TXA₂.</i>
Defecto en los gránulos plaquetarios: <i>Enfermedad del pool de almacenamiento δ.</i> <i>Síndrome de las plaquetas grises.</i> <i>Enfermedad del pool de almacenamiento α-δ.</i>
Defectos misceláneos: <i>Defectos primarios de secreción.</i> <i>Síndrome de Scott.</i>

Desórdenes adquiridos

- **Antiagregantes plaquetarios:** la ingesta de aspirina es la causa más común de estos desórdenes y puede llegar a ocasionar sangrado gastrointestinal. La aspirina inhibe la acción de la ciclo-oxigenasa, con la consecuente falla en la producción de tromboxano A₂. Una dosis de aspirina altera las plaquetas en forma permanente (7 a 10 días, porque esa es su vida media). Otros antiagregantes plaquetarios son el dipiridamol, el clopidogrel y agentes que se aplican en forma intravenosa, como el abciximab. En todos ellos

puede haber riesgo de producir trombocitopenia, sobre todo con el abciximab.

- **Hiperglobulinemia:** la hiperglobulinemia que se presenta en el mieloma múltiple y en la enfermedad de Waldenström puede causar interferencia con la adhesión y la agregación plaquetaria, así como con la liberación de sus productos.
- **Desórdenes mieloproliferativos y mielodisplásicos:** en la trombocitemia esencial y en la hemoglobinuria paroxística nocturna puede haber anomalías de la función plaquetaria.

- y **Uremia:** en estos casos siempre se producen alteraciones de la función plaquetaria, igual que en la ingesta de alcohol, con el tratamiento con heparina y con la infusión de medios de contraste para rayos X.

Diagnóstico de los desórdenes plaquetarios

Clínicamente, los pacientes con desórdenes plaquetarios se caracterizan por sangrado mucocutáneo de severidad variable, con manifestaciones como epistaxis, menorragia, petequias y sangrado excesivo posterior a cirugías o extracciones dentales. En todo paciente que se sospeche una anomalía plaquetaria debe hacerse un hemograma con análisis del frotis sanguíneo, prestando especial atención al número, tamaño y morfología de las plaquetas. Las pruebas de coagulación de rutina (TP y TTP) por lo general se encuentran normales.

En algunos casos de trombocitopenia puede ser necesario realizar un estudio de médula ósea (MO), para saber si la causa es una producción plaquetaria disminuida o una destrucción posterior de estas con aumento de los megacariocitos. En los adultos, el

mielograma es útil también para descartar desórdenes mieloproliferativos o procesos mielodisplásicos asociados a disfunción plaquetaria.

En el caso de los defectos funcionales, debe descartarse en primera instancia las causas adquiridas (ingestión de medicamentos, mielodisplasia, uremia). Si la historia clínica del paciente y las pruebas de laboratorio preliminares sugieren un defecto funcional hereditario, se debe recurrir a pruebas especializadas para llegar a un diagnóstico. Dentro de estas pruebas, el estándar de oro es la agregometría plaquetaria por transmisión de luz. En esta técnica, la exposición del plasma rico en plaquetas del paciente a distintos agonistas, ocasiona la agregación de las plaquetas presentes, la cual se mide como un cambio en la densidad óptica de la suspensión. El panel de agonistas debe incluir al menos ADP, colágeno, epinefrina, ácido araquidónico y ristocetina. Alteraciones características en el patrón de agregación normal se relacionan con diversas patologías (Cuadro N° 4) y deben ser confirmadas utilizando otras pruebas especializadas, tales como secreción plaquetaria, determinación de glicoproteínas por citometría de flujo, análisis de gránulos densos por microscopía electrónica y pruebas genéticas.

Cuadro N° 4. Patrones de agregación relacionados con defectos hereditarios en la función plaquetaria						
Defecto funcional	ADP (5 µM)	Colágeno (2 µg/ml)	Epinefrina (5 µM)	Ácido araquidónico (1,6 µg/ml)	Ristocetina (0,5 mg/ml)	Ristocetina (1,5 mg/ml)
<i>Síndrome de Bernard-Soulier</i>	N	N	N	N	N	A
<i>Trombastenia de Glanzmann</i>	A	A	A	A	N	N
<i>Enfermedad de von Willebrand tipo plaquetario</i>	N	N	N	N	I	N
<i>Enfermedad del pool de almacenamiento</i>	D	D/A	D/A	D/A	N	N

N: agregación normal; A: agregación ausente, D: agregación disminuida, I: agregación incrementada.

Tratamiento

La transfusión de concentrados plaquetarios está indicada en casos de trombocitopenia severa asociada a un fallo en la producción. En patologías asociadas a destrucción plaquetaria o consumo aumentado (por ejemplo, CID y PTT) la transfusión de plaquetas está contraindicada.

Las trombocitopenias persistentes relacionadas con

procesos inmunes responden a tratamiento con esteroides en la mayoría de los casos, pero puede ser necesario recurrir a esplenectomía en casos severos.

Los defectos plaquetarios funcionales generalmente se manejan de forma conservadora. En defectos adquiridos se debe identificar y tratar la patología de fondo, mientras que en pacientes con defectos hereditarios el manejo se basa en prevenir situaciones de riesgo de sangrado. La transfusión de concentrados

plaquetarios y el uso de agentes que favorezcan un estado procoagulante (factor VII recombinante) o la estabilidad del coágulo (agentes antifibrinolíticos) está indicado en pacientes con manifestaciones severas de sangrado que pongan en peligro su vida o en situaciones que representen un riesgo de sangrado importante, tales como cirugía mayor.

DESÓRDENES DE LA COAGULACIÓN

Se mencionan en primera instancia las deficiencias hereditarias de factores de la coagulación, debido a que -aunque no son muchos los casos- son patologías que requieren un intenso trabajo de laboratorio, no solo para diagnosticar esos problemas por primera vez, sino también para el control y el seguimiento de estos.

Hemofilia A

Este defecto es uno de los más comunes y su prevalencia se presenta en 30-100 por millón de habitantes. Su herencia es ligada al sexo, pero el 33% de los casos no tiene historia familiar, pudiendo ser producto de mutaciones espontáneas o de familias donde hayan prevalecido solo mujeres.

•γ **Genética molecular:** el gen del factor VIII está situado cerca del extremo del brazo largo del cromosoma X y contiene 26 exones. El defecto se debe a ausencia o disminución del factor VIII. Aproximadamente, el 50% de los casos tiene mutaciones o deleciones del gen del factor VIII.

•γ **Hallazgos clínicos:** en ocasiones, el sangrado puede presentarse desde la infancia; algunos niños pequeños tienen sangrado después de la circuncisión o desarrollan sangrado en las articulaciones o en los tejidos blandos. Por lo general, se presentan hemartrosis recurrentes y dolorosas, así como hematomas en músculo. Los pacientes severos, si se manejan mal, pueden llegar a tener deformidad de las articulaciones y convertirse en minusválidos.

Uno de los grandes problemas que tienen estos pacientes es que, como deben recibir terapia de reemplazo con concentrados de factor VIII durante toda su vida, poseen un alto riesgo de que se infecten con virus. De hecho, en la década de los 80 hubo gran mortalidad por el virus del Sida.

•γ **Hallazgos de laboratorio:** estos pacientes presentan TTP prolongado, factor VIII bajo y TS y TP normales.

•γ **Detección de portadoras:** las hijas de un padre hemofílico tienen el 50% de probabilidad de ser portadoras, y aunque a esas mujeres siempre les ha preocupado saber si lo son, hasta hace poco los estudios para poder definirlo eran complicados. Sin embargo, esto es más fácil en la actualidad, ya que los análisis de ADN permiten conocer con certeza si una mujer es portadora de hemofilia. Además, permiten hacer estudios prenatales para saber si un feto es hemofílico o no.

•γ **Tratamiento:** muchas veces es conveniente utilizar el término *manejo*, más que hablar de tratamiento, dado que estos casos no tienen curación y necesitan factor VIII de por vida, lo que los hace muy complicados. En la actualidad hay factores precalentados, cuyo riesgo de transmitir enfermedades infecciosas es mínimo, aunque también existe factor VIII creado por tecnología recombinante. El uso de la desmopresina (nasal o intravenosa) aumenta momentáneamente el nivel de factor VIII y puede ser utilizado en algunas condiciones. Lo más importante en todos estos pacientes es el tratamiento profiláctico permanente (aplicado muchas veces por los mismos pacientes en sus casas, ante el menor indicio o riesgo de sangrado) o cuando se van a efectuar extracciones dentarias u otros procedimientos de cirugía menor o mayor.

Es posible que en el futuro se llegue a emplear algún tipo de terapia génica; sin embargo, por el momento eso no está disponible.

•γ **Inhibidores:** cerca del 10% de los pacientes con hemofilia severa desarrollan anticuerpos contra el factor VIII. Esto causa una complicación grande en el manejo de dichas hemofilias, ya que los hace resistentes al tratamiento e implica la necesidad de usar regímenes de inmunosupresión.

También se ha encontrado este tipo de anticuerpos (inhibidores) en mujeres normales después del parto, los cuales permanecen hasta por varias semanas. En ellas el problema es leve, aunque podría volver a presentarse en embarazos futuros. Asimismo, en pacientes con trastornos inmunológicos se ha reportado este tipo de anticuerpos; a esos casos se les denomina pacientes con un anticoagulante circulante. Muchos de ellos presentan sangrados masivos, que los pueden llevar hasta la muerte.

La prueba usada para detectar estos anticuerpos consiste en hacer una mezcla del plasma normal y el del paciente en partes iguales (50/50). A cualquier TTP prolongado debería hacerse esa

mezcla, y si el tiempo de la mezcla se aproxima al del paciente, debe sospecharse la presencia de un inhibidor (ya que el plasma normal no corrigió la prolongación del paciente). En cambio, si la mezcla da un resultado semejante al del normal, eso significa que el paciente tiene una deficiencia real de uno o varios factores, la cual se corrige al añadir plasma normal.

Un método más sensible para detectar estos anticuerpos es realizar un TTP en una mezcla a partes iguales del plasma normal y del paciente e incubarla a 37° por cuatro horas, haciendo un TTP cada 60 minutos. Al mismo tiempo se harán TTPs de mezclas frescas del plasma normal y del paciente, cuyos plasmas se han mantenido incubados a 37°, pero en forma separada. En este caso, las mezclas frescas se harán cada hora. Si los resultados de la mezcla incubada desde el principio son más prolongados que los de las mezclas frescas, esto indicará la presencia de un inhibidor y el paso siguiente será saber cuál es su concentración plasmática.

Para las personas con hemofilia existe un método para cuantificar los niveles del inhibidor de factor VIII, cuyos resultados se dan en unidades Bethesda, que indicarán el nivel plasmático del anticuerpo.

Hemofilia B

Este problema de sangrado se debe a deficiencia del factor IX y se conoce también como enfermedad de Christmas. Su herencia es semejante a la de la hemofilia A, por lo que en todo paciente con diátesis hemorrágica que presente un TTP prolongado, debe diferenciarse siempre de cuál hemofilia se trata.

Los hallazgos clínicos, el análisis de portadoras y el diagnóstico son similares al de la hemofilia A, pero en estos pacientes debe cuantificarse el nivel plasmático del factor IX. El manejo también es parecido, solo que en este caso se deben dar concentrados de factor IX, los cuales tienen una vida media más larga y por eso la frecuencia de la terapéutica de reemplazo se hace a intervalos mayores.

La hemofilia B presenta inhibidores en mucho menor grado que la hemofilia A, a pesar de que ambas son sometidas a terapia transfusional sustitutiva, y solo del 2-10% de los pacientes presentan anticuerpos contra el factor IX. La metodología empleada para detectarlos es similar a la utilizada para los anticuerpos anti-VIII.

Enfermedad de von Willebrand

En 1926, Erik von Willebrand describió una enferme-

dad hemorrágica en una familia sueca, la cual llamó pseudohemofilia, porque se presentaba también en mujeres y tenía un tipo de sangrado parecido al de las deficiencias plaquetarias. Tiempo después, a este trastorno se le denominó Enfermedad de von Willebrand (EvW), en alusión a su descubridor.

En la actualidad se sabe que el factor von Willebrand (FvW) es una glicoproteína distinta al factor VIII y que ambas circulan en forma de un complejo, con una relación de una parte de F VIII y cien partes de FvW. De esta forma, el FvW evita la proteólisis del F VIII y explica por qué, en algunos casos de EvW, el F VIII se encuentra disminuido. A la vez, el FvW promueve la adhesión de las plaquetas al endotelio dañado; de ahí que la clínica de la EvW sea muy variable.

El FvW es sintetizado por las células endoteliales y por los megacariocitos, y circula en forma de multímeros que varían desde un PM de 500 kilodaltons (KDa) hasta 12.000 KDa, los cuales sirven para clasificar la enfermedad de von Willebrand en sus diferentes tipos y subtipos.

La EvW es una enfermedad hemorrágica que varía de leve a severa, presentando por lo general sangrado en mucosas desde la niñez (epistaxis y sangrado gingival), aunque también puede presentarse sangrado aumentado después de procedimientos quirúrgicos y de extracciones dentarias, así como durante la menstruación. Las hemartrosis son raras.

Dicha enfermedad se debe a una disminución del FvW o a una mutación de este. Hoy en día es la enfermedad hemorrágica hereditaria más frecuente (afecta a cerca del 1% de la población mundial). Sin embargo, la mayoría de sus casos son heterocigotos y presentan poco sangrado.

La herencia es autosómica recesiva, aunque en algunos casos es dominante y en muy pocas ocasiones adquirida; estos pacientes presentan los hallazgos de laboratorio característicos de la EvW hereditaria y se observan en lupus eritematoso diseminado, en desórdenes proliferativos y mieloproliferativos, en trastornos endocrinos y en otras condiciones.

Los hallazgos de laboratorio de la EvW son muy variables y pueden mostrar un TS y un TTP prolongados, así como agregación plaquetaria inducida por ristocetina (RIPA) anormal. El cómputo de plaquetas, el TP y la agregación plaquetaria con otros agonistas son siempre normales.

En aquellos pacientes con diátesis hemorrágica que presenten pruebas de laboratorio alteradas (como las que se han citado), es necesario efectuar análisis más

específicos, entre ellos la cuantificación del factor VIII y del FvW, la funcionalidad del FvW por medio del cofactor de ristocetina y un estudio de los multímeros del FvW. Con base en estos resultados, la EvW se clasifica en tres tipos, tal como se muestra en el Cuadro N° 5.

A pesar de que el diagnóstico parece sencillo, cada paciente puede presentar diferencias. Algunos muestran un TTP solo ligeramente prolongado, debido a que el F VIII está disminuido apenas un poco. Otros

casos presentan una RIPA más bien aumentada (subtipo II B) e incluso un TS levemente alterado.

Por otra parte, el análisis de los multímeros es una prueba que solo se realiza en laboratorios especializados, así como la cuantificación del FvW y la prueba de cofactor de ristocetina.

En el Cuadro N° 6 se muestran los cuatro subtipos de la EvW y en el Cuadro N° 7 las diferencias más importantes entre las hemofilias y la EvW.

Cuadro N° 5. Clasificación de la enfermedad de von Willebrand	
Tipo 1	Deficiencia cuantitativa parcial.
Tipo 2	Anormalidad funcional.
Tipo 3	Deficiencia completa (homocigota).

Cuadro N° 6. Clasificación de los tipos 2 de enfermedad de von Willebrand			
Subtipos	Función plaquetaria	Capacidad unión al F VIII	Multímeros APM
2 A	Disminuida	Normal	Ausente
2 B	Afinidad por GP Ib	Normal	Reducida/ausente
2 M	Disminuida	Normal	N o ultra grandes
2 N	Normal	Reducida	Normal

GP: glicoproteína plaquetaria de membrana. APM: alto peso molecular.

Cuadro N° 7. Principales diferencias entre las hemofilias y la enfermedad de von Willebrand			
	Hemofilia A	Hemofilia B	EvW
Herencia	Ligada al sexo	Ligada al sexo	Dominante (incompleta)
Sitios de sangrado	Músculo Articulaciones	Músculo Articulaciones	Membranas mucosas Cortaduras de piel
Plaquetas	Normales	Normales	Normales
TS	Normal	Normal	Prolongado
TP	Normal	Normal	Normal
TTP	Prolongado	Prolongado	Normal o prolongado
Factor VIII	Bajo	Normal	Reducido moderadamente

Cuadro N° 7. Principales diferencias entre las hemofilias y la enfermedad de von Willebrand			
	Hemofilia A	Hemofilia B	EvW
Factor IX	Normal	Bajo	Normal
FvW	Normal	Normal	Bajo o afuncional
RIPA	Normal	Normal	Alterada

RIPA: agregación plaquetaria inducida por ristocetina.

El FvW, por producirse en el endotelio, es una proteína de fase aguda que aumenta por daño vascular, por inflamación y en las neoplasias y el embarazo.

Para el tratamiento de los casos Tipo 1 se utiliza desmopresina, la cual libera el FvW del endotelio, y como el factor liberado es normal, la hemostasia se normaliza momentáneamente. Sin embargo, en los Tipo 2 la desmopresina no sirve para nada, dado que el FvW que se libera del endotelio es anormal. Incluso, en los casos 2B la desmopresina está contraindicada, porque puede producirse trombocitopenia por agregación plaquetaria *in vivo*.

La otra forma de tratamiento es dar FvW de manera purificada y suministrar al mismo tiempo concentrados de F VIII, para que la hemostasia mejore rápidamente.

DESÓRDENES HEREDITARIOS DE OTROS FACTORES DE LA COAGULACIÓN

Las deficiencias hereditarias de fibrinógeno, protrombina y factores V, VII, o combinadas de V y VIII, X, XI y XIII son raras; en la mayor parte de los casos la herencia es autonómica recesiva. También se han reportado deficiencias hereditarias de carboxilasa que cursan con deficiencia de todos los factores dependientes de la vitamina K.

Todos estos casos pueden presentar problemas de sangrado y se manejan con terapia sustitutiva. El diagnóstico debe hacerse cuantificando los respectivos factores en el laboratorio.

La deficiencia de factor XI se observa en judíos Ashkenazi y se presenta en ambos sexos, al igual que las otras deficiencias citadas anteriormente.

La deficiencia de factor XIII produce diátesis hemorrágicas severas que pueden sangrar por cordón umbilical; pero lo característico de estos casos es que el sangrado se produzca varias horas después del traumatismo o herida, cuando el coágulo de fibrina no

logra consolidarse por la ausencia del factor XIII.

DESÓRDENES ADQUIRIDOS DE LA COAGULACIÓN

Estos problemas son mucho más comunes que los desórdenes hereditarios y se observan todos los días en medicina. A diferencia de los trastornos hereditarios, presentan deficiencias múltiples de los factores de la coagulación.

Deficiencia de vitamina K

La vitamina K se obtiene de los vegetales verdes y de la síntesis bacteriana en el intestino. Su deficiencia es responsable de la enfermedad hemorrágica del recién nacido, aunque también puede encontrarse a otras edades.

Esta deficiencia puede ser causada por dieta inadecuada, mala absorción o inhibición por medicamentos como los anticoagulantes orales, que son las drogas antagónicas de la vitamina K.

La warfarina se asocia con niveles funcionales disminuidos de los factores II, VII, IX y X, así como con reducción de las proteínas C y S. Estos factores y proteínas que se producen son afuncionales, debido a que ese anticoagulante inhibe la gama carboxilación, necesaria para que esas moléculas fijen el calcio y se hagan funcionales.

• *Enfermedad hemorrágica del recién nacido (EHRN)*

Los niveles de los factores dependientes de la vitamina K se encuentran disminuidos al nacimiento (caen todavía más a las semanas en los niños alimentados con leche materna), debido a la inmadurez hepática, la falta de síntesis intestinal por la poca presencia de bacterias y la baja cantidad de esa vitamina en la leche materna. Todo esto hace posible que se pueda producir una hemorragia en la etapa neonatal, usualmente entre

el segundo y el cuarto día de vida, e incluso hasta los dos meses. Para evitar este problema, casi en todo el mundo se aplica una dosis profiláctica de vitamina K cuando nacen los niños, en forma de una inyección intramuscular de 1 mg de vitamina K, aunque también puede darse de manera oral.

Algunas veces esta condición puede presentarse en aquellos niños de dos o tres meses de edad alimentados exclusivamente al pecho materno y que reciben antibióticos o que presentan diarrea, por lo que es necesario tomar en cuenta esta forma tardía de enfermedad hemorrágica neonatal.

Si se da la EHRN, se debe aplicar vitamina K cada seis horas y dar plasma fresco congelado. En estos casos, tanto el TP como el TTP están prolongados.

•γ **Deficiencia de vitamina K en niños o adultos**

En los casos de ictericia obstructiva, pancreatitis y enfermedad del intestino delgado, pueden darse casos de sangrado por disminución de los factores de la coagulación dependientes de vitamina K y el diagnóstico es semejante.

Enfermedad hepática

Múltiples condiciones de la hemostasia favorecen la tendencia al sangrado, que puede ser exacerbado por la presencia de várices esofágicas. Algunas de ellas son: la obstrucción biliar, el daño hepatocelular severo y la CID, debido a la liberación de tromboplastina por daño hepático.

Hay que recordar que en estos casos también se ve alterada la síntesis de inhibidores de la coagulación, como es el caso de la antitrombina, la proteína C y la alfa 2 antiplasmina. A la vez, existe una remoción defectuosa de los factores de la coagulación activados y una actividad fibrinolítica aumentada.

Coagulación intravascular diseminada

El depósito de fibrina intravascular, con el respectivo consumo de factores de la coagulación y de las plaquetas, se produce como consecuencia de diferentes causas. La mayoría de los pacientes presentan sangrado severo, aunque del 5-10% de los casos se manifiestan como lesiones microtrombóticas (con acrocianosis distal y gangrena de los miembros).

El patrón que se observa es una liberación aumentada del factor tisular, que puede producirse por causa de tumores, por reacción inflamatoria, por trauma o por daño endotelial por problemas infecciosos (Cuadro N° 8).

Cuadro N° 8. Causas de coagulación intravascular diseminada
<i>Infecciones</i> - Septicemias por Gran negativos o por <i>Clostridium welchii</i>.
<i>Malignidad</i> - Adenocarcinoma diseminado. - Leucemia promielocítica.
<i>Complicaciones obstétricas</i> - Embolismo por fluido amniótico. - Separación prematura de placenta. - Eclampsia. - Aborto séptico o retención de placenta.
<i>Reacciones de hipersensibilidad</i> - Anafilaxis. - Transfusión de sangre incompatible.
<i>Daño tisular severo</i> - Después de cirugía o trauma. - Quemaduras severas.
<i>Anormalidades vasculares</i> - Síndrome de Kasabach-Merritt. - Cirugía cardíaca (bypass). - Aneurismas vasculares.

Cuadro N° 8. Causas de coagulación intravascular diseminada*Misceláneas*

- Daño hepático o pancreatitis.
- Mordeduras de serpientes.
- Pérdida masiva de sangre.
- Hipotermia o hipoxia aguda.

El diagnóstico debe hacerse por la clínica, donde se encontrará sangrado agudo por múltiples sitios, lesiones de piel y acrocianosis distal (debido a los microtrombos). Algunos casos, como la púrpura fulminante, son muy severos y deben vigilarse muy de cerca, por la posibilidad de que se produzca necrosis de las extremidades.

El laboratorio muestra TP, TTP y TT prolongados, plaquetas y fibrinógeno bajos, así como productos de degradación del fibrinógeno-fibrina y dímero D aumentados. El frotis sanguíneo puede mostrar fragmentación eritrocitaria, debido a que la fibrina se deposita en la microcirculación y eso hace que los eritrocitos se fraccionen.

El tratamiento consiste en controlar la enfermedad que la produjo y en resolver el sangrado o la trombosis en la forma usual, tanto con plasma fresco congelado, como con anticoagulantes o antiagregantes plaquetarios.

Deficiencia de la coagulación causada por anticuerpos

Los anticuerpos circulantes contra los factores de la coagulación se presentan en algunas condiciones médicas con cierta frecuencia. Por ejemplo, los autoanticuerpos producidos en los hemofílicos, y los que se encuentran en mujeres después del parto, en artritis reumatoidea, cáncer y en personas mayores, quienes mantienen niveles de esos anticuerpos hasta por varias semanas.

En pacientes con trastornos inmunológicos se han reportado anticuerpos IgG o IgM, que interfieren con los pasos de la coagulación y que dependen de las lipoproteínas (Xa-Va-calcio-fosfolípidos). Este tipo de anticuerpo (que presenta un TTP prolongado) se ha llamado *anticoagulante lúpico*, a pesar de que solo el 10% de los pacientes con lupus eritematoso diseminado lo desarrollan. No inhibe específicamente ningún factor conocido y no produce tendencia aumentada al sangrado. Su importancia radica en la capacidad de producir trombosis arterial y venosa, así como complicaciones obstétricas. La capacidad trombofílica que presenta no está clara, aunque algunos aspectos concretos son la inhibición de la trombomodulina, la inhibición de la liberación de la

prostaciclina endotelial, la disminución de la actividad fibrinolítica y la interferencia con la actividad de la antitrombina.

Este inhibidor fue descrito en un inicio en pacientes con lupus eritematoso y de ahí su nombre; sin embargo, posteriormente se ha descrito en varias enfermedades autoinmunes, neoplásicas, infecciones, desórdenes mieloproliferativos y reacciones a drogas, y el nombre debería cambiarse al de inhibidor del TTP o al de inhibidor antifosfolípido.

La investigación de laboratorio se hace por medio del TTP, y su prolongación no se corrige con plasma normal en proporciones de 50/50. Otras pruebas que valoran esta vía de la coagulación también se pueden alterar.

La sospecha de este inhibidor debe hacerse en pacientes con enfermedad trombótica que presenten abortos espontáneos recurrentes; aunque en estos casos se debe definir claramente la presencia de una enfermedad autoinmune mediante la realización de otros estudios de laboratorio, como la investigación de anticuerpos (IgG e IgM) antifosfolípidos y la de los anticuerpos anticardiolipinas. Otras pruebas de coagulación que se utilizan para investigar este anticuerpo son el tiempo de coagulación con caolín y la prueba con veneno de víbora de Russel.

Se han observado también acortamientos en las pruebas basales de coagulación.

Síndrome de transfusión masiva

Diferentes causas pueden producir una diátesis hemorrágica después de una transfusión masiva. El sangrado se presenta por plaquetas bajas o por disminución de los factores de la coagulación o de sus inhibidores.

El manejo de estos casos debe hacerse con concentrados de plaquetas y con reposición de los factores de la coagulación.

En el Cuadro N° 9 se hace un resumen de las principales pruebas de laboratorio que se encuentran alteradas en los casos de los desórdenes adquiridos de la coagulación sanguínea.

Cuadro N° 9. Resultados típicos en los trastornos adquiridos de la coagulación

	Plaquetas	TP	TTP	TT
Enfermedad hepática	Bajas	Prolongado	Prolongado	N (por lo gral.)
CID	Bajas	Prolongado	Prolongado	Muy prolongado
Transfusión masiva	Bajas	Prolongado	Prolongado	Normal
Anticoagulantes orales	Normales	Muy prolongados	Prolongados	Normales
Heparina	N (por lo gral.)	Poco prolongado	Prolongado	Prolongado
Anticoagulante circulante	Normales	N o prolongado	Prolongado	Normal

RESUMEN DEL CAPÍTULO

- Los desórdenes de la función plaquetaria pueden ser adquiridos o hereditarios.
- La disfunción plaquetaria se puede presentar por distintos mecanismos y en diversos componentes de la plaqueta.
- En pacientes con defectos plaquetarios cuantitativos o cualitativos prevalece el sangrado de tipo mucocutáneo.
- La prueba de agregometría plaquetaria por transmisión de luz es el estándar de oro en el diagnóstico de defectos de la función plaquetaria.

BIBLIOGRAFÍA

Enciclopedia Iberoamericana de Hematología. España: Ediciones Universidad de Salamanca; 1992.

Erber WN, Perry DJ. Plasma and plasma products in the treatment of massive haemorrhage. *Best Pract Res Clin Haematol* 2006; 19(1): 97-112.

Harrison P, Mackie I, Mumford A, Briggs C, Liesner R, Winter M, *et al.* Guidelines for the laboratory investigation of heritable disorders of platelet function. *Br J Haematol* 2011; 155(1): 30-44.

Hayward CP, Rao AK, Cattaneo M. Congenital platelet disorders: overview of their mechanisms, diagnostic evaluation and treatment. *Haemophilia* 2006; 12(Suppl. 3): 128-136.

Hayward CP. Diagnostic evaluation of platelet function disorders. *Blood Rev* 2011; 25(4): 169-173.

Hoffbrand AV, Moss PAH, Pettit JE. *Essential hematology*. 5 ed. Oxford, UK: Blackwell Publishing; 2006.

Lee R, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer J, Rodgers G. *Wintrobe's clinical hematology*. 10 ed. Baltimore: Williams and Wilkins; 1998.

Lillicrap D, James P. *Enfermedad de von Willebrand: introducción para médicos de atención primaria*. Canadá: Federación Mundial de Hemofilia; 2009.

Mannucci PM. Hemophilia: treatment options in the twenty-first century. *J Thromb Haemost* 2003; 1(7): 1349-1355.

Podda G, Femia EA, Pugliano M, Cattaneo M. Congenital defects of platelet function. *Platelets* 2012; 23(7): 552-563.

Ruggeri ZM, Zimmerman TS. Von Willebrand factor and von Willebrand disease. *Blood* 1987; 70(4): 895-904.

Watson SP, Harrison P. The vascular function of platelets. En: Hoffbrand VH, Catovsky D, Tuddenham EGD. *Postgraduate hematology*. 5 ed. Reino Unido: Blackwell; 2005. p. 808-824.

Dra. María Paz León Bratti
Dr. Jorge Fonseca González

INTRODUCCIÓN

El síndrome antifosfolípido (SAF) o síndrome de Hughes, descrito por primera vez en los años ochenta, es una alteración caracterizada por trombosis recurrentes, pérdidas en el embarazo y trombocitopenia asociadas con la presencia de anticuerpos antifosfolípidos (aAF) y pruebas persistentes positivas de anticardiolipinas o anticoagulante lúpico. Su diagnóstico requiere que el paciente presente ambas: un evento clínico (trombótico o de pérdida gestacional) y presencia persistente de aAF.

Existen en el SAF autoanticuerpos dirigidos contra glicoproteínas de la superficie celular en concierto con

fosfolípidos aniónicos. Estos anticuerpos ocurren tanto en forma espontánea (SAF primario) como asociados a una variedad de condiciones autoinmunes, particularmente el lupus eritematoso sistémico (LES), y a infecciones virales, en especial la infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH).

Específicamente, hay dos grupos de anticuerpos bien reconocidos en el SAF: los **anticuerpos anticardiolipinas (aCL)** y el **anticoagulante lúpico (AL)** (Cuadro N° 1). El antígeno primario al que se unen los aAF es la $\beta 2$ glicoproteína 1 ($\beta 2$ GP1), una proteína plasmática de unión a fosfolípidos, miembro de la familia de proteínas de control del complemento.

Cuadro N° 1. Grupos de autoanticuerpos ligados al SAF

1. Anticuerpos anticardiolipina (aAC):

- γ Anticuerpo dirigido contra una glicoproteína (por lo general $\beta 2$ GP1), en conjunto con cardiolipina.
- γ Se asocian a un VDRL falso reactivo.
- γ Se detectan mediante pruebas de ELISA.
- γ Los anticuerpos pueden ser de tipo IgG, IgA o IgM.

2. Anticoagulante lúpico (AL)

- γ Inhibidor no-específico.
- γ Tiempo de coagulación prolongado en las pruebas de coagulación dependientes de fosfolípidos (TTP y TP).

La trombosis es la causa más frecuente de muerte en los EEUU y probablemente en el mundo entero. Cerca del 80-90% de las causas de las trombosis pueden ser definibles en cuanto a etiología. Se estima que más del 50% de los pacientes que las sufren son portadores de una alteración congénita o adquirida de las proteínas de la coagulación o un defecto plaquetario. Hoy se reconoce que el SAF es una de las causas más importantes de hipercoagulabilidad. El identificar correctamente a estos individuos con tendencia trombofílica es de gran relevancia, ya que permite dar terapia antitrombótica adecuada para disminuir el riesgo de recurrencia, determinar el período de tiempo

que el paciente debe permanecer en tratamiento como prevención secundaria y estudiar a miembros de la familia para prevenir eventos trombóticos.

PERSPECTIVA HISTÓRICA

Los aCL se detectaron por primera vez durante la II Guerra Mundial, en pacientes con pruebas biológicas falso positivas para sífilis. Alrededor de los años cincuenta se determinó su relación con el LES, pero fue hasta 1986 que los aCL fueron formalmente descritos, por Harris *et al*, al desarrollar una nueva prueba para detectar anticuerpos antifosfolípidos utilizando cardiolipina.

El AL, por su parte, fue observado por primera vez en 1952 por Conley y Hartmann en dos pacientes con LES; su asociación con trombosis se describió en 1963 y poco después se determinó que este AL se podía encontrar en muchos individuos sin enfermedad autoinmune. El término "anticoagulante lúpico" como tal, fue propuesto en 1972 por Feinstein y Rapaport.

En cuanto al SAF, este fue descrito con ese nombre en 1983, por Hughes. En 1990 dos grupos de investigadores en forma independiente reportaron la especificidad de los aAF, especialmente contra la β 2GP1, la cual se une a fosfolípidos aniónicos y además, posee propiedades anticoagulantes débiles, inhibiendo la fase de contacto de la coagulación, la activación de la proteína C y del factor Xa de la cascada de la coagulación, así como la actividad protrombinasa de las plaquetas.

Antes se creía que los aAF reaccionaban directamente con fosfolípidos aniónicos; sin embargo, con los estudios sobre la β 2GP1, se ha demostrado que los aAF están dirigidos contra complejos proteína-fosfolípidos. La β 2GP1 desempeña un papel relevante en las pruebas ELISA que miden *in vitro* los aCL; además, al unirse a los fosfolípidos aniónicos inhibe la vía intrínseca de la coagulación, actuando como si fuera un anticoagulante natural. Todo esto establece la paradoja de un síndrome trombofílico donde se obtienen resultados (TTP) 'compatibles' con discrasia de sangrado.

EPIDEMIOLOGÍA

Títulos bajos de aCL se observan en menos del 10% de los donadores de sangre y títulos moderados o altos de aCL o pruebas positivas de AL ocurren en menos del 1%. La prevalencia de pruebas positivas de aAF aumenta con los años, por lo que en pacientes de mayor edad se debe ser muy cuidadoso en el diagnóstico de SAF.

Por otra parte, se ha descrito que entre 30-40% de los pacientes con LES tiene pruebas positivas de aAF, al igual que el 20% de las personas con artritis reumatoide.

La asociación entre la presencia de los aAF y los eventos clínicos varía mucho en los reportes de la literatura.

CARACTERÍSTICAS DEL SÍNDROME ANTIFOSFOLÍPIDO

El SAF involucra dos síndromes clínicos diferentes, pero muy relacionados entre sí: el síndrome de anticoagulante lúpico (SAL) y el síndrome de aCL (SACL). Estos síndromes son similares, aunque se diferencian tanto en aspectos clínicos como bioquímicos y de la-

boratorio, en especial en cuanto a prevalencia, causas, mecanismos involucrados, presentación clínica, diagnóstico de laboratorio y manejo.

El SACL es cinco veces más común que el SAL. Ambos síndromes se pueden asociar a trombosis arterial o venosa, abortos y trombocitopenia. Sin embargo, el SAL se relaciona principalmente con trombosis venosa y no tanto con trombosis arterial; mientras que el SACL suele asociarse con trombosis venosa y arterial, que incluye la típica trombosis venosa profunda y el embolismo pulmonar, así como la enfermedad coronaria y cerebrovascular prematuras y la enfermedad vascular retineana.

Los dos síndromes se clasifican como **primarios** cuando se diagnostican en individuos 'sanos' sin condiciones médicas adicionales presentes; y **secundarios** cuando se asocian con LES, enfermedades de la colágena y diversos padecimientos de carácter autoinmune, neoplasias, infección por virus de inmunodeficiencia humana, drogas y otras condiciones médicas.

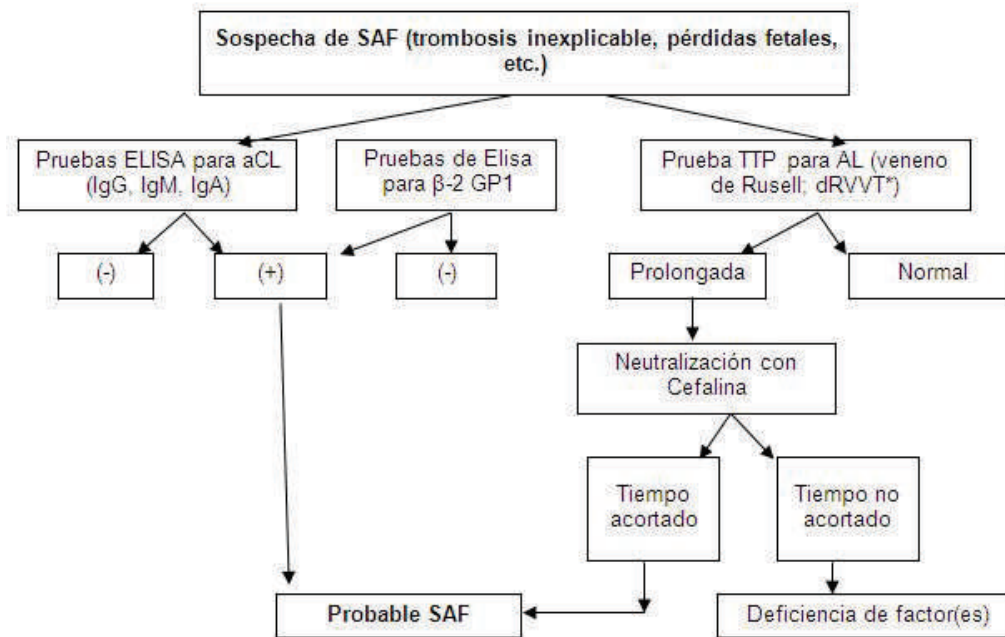
La mayoría de los individuos con SACL primarios no tienen AL y viceversa. No obstante, aquellos casos con SAF secundarios, por lo general, tienen gran heterogeneidad en los aAF que poseen y reaccionan tanto con AC como con AL.

Inicialmente se pensó que solo los aAC tipo IgG estaban relacionados con trombosis; sin embargo, los aCL tipo IgA e IgM también se asocian con frecuencia a esa coagulopatía y no hay relación entre el tipo de evento trombótico y el idiotipo presente.

INMUNOPATOLOGÍA DEL SÍNDROME ANTIFOSFOLÍPIDO

Los aAF representan una familia heterogénea de autoanticuerpos, cuyo blanco principal son las proteínas del plasma que se unen a fosfolípidos, con mayor frecuencia la β 2GP1, y que se pueden detectar por diferentes pruebas (Figura N° 1). Estas proteínas se unen a fosfolípidos cargados negativamente, como cardiolipina, fosfatidilglicerol, fosfatidilserina.

Entre las proteínas del plasma que pueden actuar como epítopos de los aAF están la ya mencionada β 2GP1, la protrombina, la proteína C, la proteína S, la trombomodulina, la antitrombina III, la fosfolipasa A y las anexinas I y V. El hecho de que los aAF tengan como blanco ciertas proteínas plasmáticas, permite comprender su papel en la alteración de los controles normales de la coagulación. Sin embargo, no explica qué origina su presencia. El fosfolípido que posee mayor relevancia *in vivo* para la unión de estas proteínas es la fosfatidilserina.



*Alternativamente se puede usar un TTP activado, con una prueba de Exner añadida si da prolongado.

Figura N° 1. Procedimiento de escrutinio para el estudio de SAF.

El mecanismo patogénico por el cual los aAF inducen trombosis se desconoce, aunque es probable que estén involucrados varios mecanismos y no solo uno. Datos publicados indican que los aAF pueden provocar trombosis a través de una variedad de mecanismos protrombóticos, que incluyen activación de células endoteliales (mediante aumento del factor tisular y las moléculas de adhesión), activación de plaquetas, estimulación de la producción de tromboxano, inhibición de la activación de la proteína C, activación de complemento, efectos inhibitorios en la vía fibrinolítica y otras vías de la cascada de la coagulación, interacción entre los aAF y el escudo anticoagulante formado por anexina V.

Con frecuencia, una infección precede al desarrollo y detección de los diversos aAF y, en algunos casos, parecen seguir al uso de fármacos como la procainamida, la hidralacina, la clorpromacina y la quinidina. Varios autores han señalado que los aAF son secundarios a daño vascular. Esta posibilidad plantea que determinadas proteínas del plasma forman un nuevo epítopo al unirse a fosfolípidos cargados negativamente (como la fosfatidilserina) y que han sido expuestos en superficies endoteliales dañadas. No obstante, la mayoría de los investigadores consideran que el mayor determinante antigénico, al menos de los aCL, es la $\beta 2\text{GP1}$.

Por otra parte, varias observaciones sugieren una asociación entre la apoptosis (muerte celular programada) y el SAF. La exposición alterada de fosfolípidos durante los mecanismos de apoptosis puede ser el estímulo antigénico inicial para la producción de aAF. Se ha demostrado que los complejos moleculares de proteína y fosfolípidos que se forman durante la apoptosis son el blanco de aAF patogénicos. Además, se ha establecido tanto en modelos experimentales animales como a través del análisis de la patología humana, que una predisposición genética de base es tal vez fundamental para el desarrollo de estas respuestas inmunes.

Actualmente, hay diversas drogas asociadas con el SAF, entre las cuales destacan la fenitoina, la quinidina, la quinina, las fenotiazinas, la cocaína, el interferon- δ , la procainamida, la hidralazina y el fansidar. En estas situaciones de SAF inducido por drogas, por lo general, el aAF es de tipo IgM y asociado a trombosis.

Debido a que no hay un mecanismo único de trombosis en el SAF, como ya se mencionó, se ha especulado que existen distintos subgrupos de SAF, con diferentes mecanismos de trombosis o que son necesarias varias alteraciones antes de llegar al estado trombogénico.

En vista del gran espectro de autoanticuerpos asociados con el SAF, es poco probable que solo un

mecanismo protrombótico esté en juego. Tampoco se debe perder de vista que en algunos casos los aAF pueden ser solo un epifenómeno de daño celular (vascular) de cualquier otra causa.

En cuanto a los mecanismos de pérdida fetal asociados a aAF, se sabe que existe una fuerte asociación entre pérdida fetal recurrente y aCL. Cerca del 40% de las mujeres con pérdidas fetales recurrentes tendrá una prueba positiva por aCL. ¿Por qué ocurre la pérdida fetal? Esto tampoco está claro aún, pero podría tratarse de un desorden mediado inmunológicamente o estar asociado a trombosis placentaria. Los estudios animales sugieren que los aAF juegan un papel patológico directo en la pérdida fetal. Sin embargo, no se puede simplificar la patogénesis de la pérdida fetal en el SAF, asumiendo que es mediada solo por trombosis placentaria. Esta puede ocurrir, pero no es universal. El mecanismo primario parece ser una vasculopatía de la arteria espiral, que es el mismo tipo de vasculopatía que se observa en la preeclampsia. El resultado final de la vasculopatía es la alteración del flujo sanguíneo de la arteria espiral materna al espacio intravelloso.

Entre las hipótesis aceptadas en la actualidad se encuentra la "hipótesis del segundo golpe", en la cual un segundo evento gatillo (como el uso de anticonceptivos orales o cirugías) que por sí solo no era suficiente para producir trombosis, hace que un paciente asintomático con aAF desarrolle trombosis. También los factores de riesgo para trombosis, tanto adquiridos como hereditarios, aumentan el riesgo de esta en pacientes con aAF.

MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Pueden ser múltiples y muy variadas, desde los casos asintomáticos hasta el SAF catastrófico. Pueden involucrar casi cualquier órgano y sistema, aunque los pacientes con SAF se presentan clínicamente en cuatro formas predominantes: trombosis venosa, trombosis arterial, pérdida fetal y trombocitopenia. La gran mayoría de los casos se detectan después de un evento trombótico arterial o venoso.

Cabe destacar que las trombosis en el SAF no son diferentes clínicamente de las trombosis por otras causas, lo que las caracteriza es su severidad, la juventud de los casos afectados y la localización anatómica inusual que pueden presentar.

Los aAF se han asociado con muchos tipos de trombosis venosas incluyendo: trombosis venosa profunda de miembros superiores e inferiores, embolismo pulmonar, trombosis de venas intracraneales, vena

cava inferior, vena hepática, vena porta, vena renal y venas retineanas. Según investigaciones realizadas, las trombosis venosas son responsables del 71% de las trombosis en el SAF. Una inexplicable trombosis venosa, en particular si el paciente es menor de 50 años, exige un estudio por SAF. De igual forma, si lo que se presenta es una trombocitopenia asociada a un evento trombótico actual o pasado.

Los aCL también se han asociado con diferentes formas de trombosis arterial. Los sitios afectados pueden incluir arterias coronarias, carótidas, arterias cerebrales y retineanas, arteria subclavia o axilar, arterias braquiales, mesentéricas, periféricas, así como aorta proximal o distal.

Los problemas cutáneos son tal vez las manifestaciones más frecuentes del SAF. Estos pueden presentarse como *livedo reticularis*, síndrome por trombosis venosa profunda recurrente, púrpura necrotizante, úlceras de estasis en los tobillos, isquemia o necrosis de extremidades enteras, gangrena periférica, púrpura necrotizante, hemorragia (equimosis o hematoma) y úlceras ungueales.

Un sistema frecuentemente afectado es el neurológico, lo que conduce a gran morbilidad. En este sistema se ha descrito que el SAF puede causar isquemia cerebral transitoria, accidente vascular cerebral, demencia por infartos múltiples, corea, mielopatía transversa, encefalopatía, migrañas complicadas, *pseudotumor cerebro* y trombosis venosa.

Las manifestaciones cardíacas son frecuentes y pueden ser una causa importante de muerte prematura. Dentro de ellas se describen: angina de pecho, infarto del miocardio, vasculopatía coronaria, vegetaciones valvulares y trombos intracardiacos.

A nivel pulmonar se describen el clásico embolismo pulmonar y la hipertensión pulmonar, por lo general, debida a múltiples embolismos pequeños que ocurren en forma crónica.

Otra presentación frecuente, como ya se mencionó, es la trombocitopenia, la cual se puede asociar a ambos SAF, suele ser moderada a severa, es frecuente y ocurre en cerca del 50% de los pacientes con SAF secundario, pero en menos del 10% de los pacientes con SAF primario. El mecanismo patofisiológico pareciera estar relacionado con la sensibilización de plaquetas por anticuerpos unidos a fosfolípidos en su superficie. Existe una alta correlación entre aAF tipo IgA y trombocitopenia, aunque también puede ocurrir asociada a aAF tipo IgG e IgM. Independientemente del grado de trombocitopenia, la trombosis es siempre la

manifestación clínica más importante y no el sangrado. Desde el punto de vista hematológico, el SAF también se puede asociar a anemia hemolítica.

En cuanto a las manifestaciones gastrointestinales, estas son menos frecuentes, pero se ha descrito síndrome de Budd-Chiari e infarto hepático. También se pueden presentar trastornos renales como trombos glomerulares, insuficiencia renal, hipertensión arterial acelerada y trombosis de la arteria o la vena renal.

Otras manifestaciones de importancia clínica son las oftalmológicas, donde el SAF puede ser causa de oclusión de la vena o arteria retineana, retinopatía vascular oclusiva y neuropatía óptica isquémica.

Los aCL se asocian con una frecuencia aumentada

de pérdida fetal. Las características de este síndrome son: abortos frecuentes, especialmente en el primer trimestre del embarazo, pérdida fetal recurrente en el segundo y tercer trimestre, vasculitis de la placenta y, con menor frecuencia, trombocitopenia materna. Las mujeres con aCL tienen cerca del 50-75% de posibilidad de pérdida fetal.

CRITERIOS DIAGNÓSTICOS

Existe un acuerdo internacional sobre los criterios diagnósticos de SAF; la revisión más reciente de estos es del año 2004 y obedece a un consenso internacional de expertos. Estos criterios son clínicos y de laboratorio (Cuadro N° 2). La presencia de ambos es necesaria para el diagnóstico.

Cuadro N° 2. Criterios diagnósticos para SAF

I - Criterios clínicos

1. **Trombosis vascular:** uno o más episodios clínicos de trombosis arterial, venosa o de pequeños vasos en cualquier tejido u órgano. *(La trombosis debe ser confirmada por criterios objetivos validados como hallazgos inequívocos de estudios apropiados de imágenes o histopatología. Para la confirmación histopatológica, la trombosis debe estar presente sin evidencia significativa de inflamación de la pared del vaso).*
2. **Morbilidad del embarazo:**
 - Una o más muertes sin explicación de un feto morfológicamente normal, de 10 o más semanas de gestación *(morfolología fetal normal documentada por ultrasonido o examen directo del feto).*
 - Uno o más nacimientos prematuros de neonatos morfológicamente normales antes de la semana 34 de gestación, debidos a eclampsia, preeclampsia severa, o insuficiencia placentaria por hallazgos aceptados.
 - Tres o más abortos espontáneos consecutivos sin causa aparente antes de las 10 semanas de embarazo, excluyendo anomalías maternas anatómicas u hormonales y causas cromosómicas maternas o paternas.

II - Criterios de laboratorio

1. **Anticoagulante lúpico:** presente en el plasma en dos o más ocasiones separadas al menos 12 semanas, detectados de acuerdo con las guías de la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia.
2. **Anticuerpo anticardiolipina:** isotipo IgG o IgM en suero o plasma, en títulos altos o medios; por ejemplo, sobre 40 unidades de fosfolípido o sobre el percentil 99, en dos o más ocasiones, separados al menos 12 semanas, medidos por ELISA estandarizado.
3. **Anticuerpo anti-beta 2 glicoproteína I:** isotipo IgG o IgM, presente en suero o plasma (en título sobre el percentil 99), en dos o más ocasiones al menos 12 semanas aparte, medido por ELISA estandarizado.

Se considera la presencia de un SAF definitivo cuando existe al menos un criterio clínico y un criterio de laboratorio.

DETECCIÓN DE LABORATORIO

El SAF se diagnostica cuando se presentan eventos clínicos característicos y se demuestra presencia persistente de aAF que incluyen niveles moderados o altos de aCL IgG o IgM, niveles moderados o altos de anti-β2GPI IgG o IgM, o AL positivo.

Los AL y los aAC con frecuencia están positivos en forma transitoria, particularmente en pacientes con infecciones recientes, por lo que no se debe olvidar ni subestimar que se requiere la positividad seriada para el diagnóstico del síndrome.

Los aCL suelen detectarse por pruebas de tipo ELISA. Estas cuantifican anticuerpos IgG, A o M anticardiolipina y permiten la determinación seriada de los niveles de anticuerpos. Su problema principal es que en la actualidad existen muchos 'kits' con sensibilidades diferentes. Desde el punto de vista de interpretación, se debe considerar el hecho de que no existe un nivel límite aceptado para los valores normales o de referencia. Debido a que hay variaciones importantes entre laboratorios y entre métodos tanto en las mediciones comerciales como "caseras" de aCL y AL, y esto puede limitar el valor diagnóstico de los resultados de estas pruebas, se han tratado de establecer guías de consenso para su realización.

Dado que la principal proteína a la que se unen los aCL es la β2GP1, la detección de anticuerpos específicos contra ella detectados en platos de ELISA, está siendo cada vez más utilizada como método diagnóstico de SAF. Se ha sugerido que los anticuerpos contra β2GP1 son más específicos y predicen mejor las complicaciones.

En cuanto al AL, como se mencionó en los criterios diagnósticos, la sospecha se basa en la prolongación de las pruebas de la coagulación dependientes de fosfolípido, dado que el AL interfiere con la formación de los complejos de la coagulación en la superficie de fosfolípidos. En la actualidad hay muchas pruebas disponibles para ello. El cuadro se puede comenzar a sospechar cuando existe una prolongación del TTP o del TP. La confirmación de este se realiza a través de la normalización de los tiempos de coagulación con la adición de un exceso de fosfolípidos, los cuales idealmente no deben ser de plaquetas.

Se recomienda considerar algunas reglas generales en la interpretación de pruebas positivas de aAFL:

- γ Niveles moderados o altos (> 40 U) de aCL o aβ2GP1 se asocian más con eventos clínicos con los niveles bajos.

- γ El AL es un predictor más específico pero menos sensible de trombosis que otras pruebas de aAF.
- γ Varias pruebas positivas de aAF acarrearán un peor pronóstico que una sola prueba positiva.
- γ Todas las pruebas positivas requieren de una confirmación a las 12 semanas, para excluir aAF transitorios.

CONCLUSIÓN

El SAF es una enfermedad sistémica autoinmune, caracterizada por la presencia de trombosis, pérdidas fetales y niveles persistentes altos de aAF. No hay estudios definitivos para afirmar el mecanismo patogénico en humanos, pero por lo que se ha demostrado en estudios animales, lo más probable es que involucre inflamación y activación del complemento. La enfermedad es clínicamente muy heterogénea y sus mecanismos diversos, por lo que es poco probable que un solo mecanismo sea el que se pueda aplicar a todos los aspectos de la enfermedad. En la actualidad el tratamiento de estas personas se basa en anticoagulación; sin embargo, es probable que en el futuro involucre el uso de agentes inmunomoduladores.

RESUMEN DEL CAPÍTULO

- γ El SAF se caracteriza por trombosis recurrentes, pérdidas en el embarazo y presencia persistente de anticuerpos antifosfolípidos (aAF).
- γ Los aAF que se buscan son niveles moderados o altos de aCL IgG o IgM, niveles moderados o altos de anti-β2GP1 IgG o IgM, o AL positivo
- γ Su diagnóstico requiere que el paciente presente ambas: un evento clínico (trombótico o de pérdida gestacional) y presencia persistente de aAF.
- γ Los aAF son una familia de auto anticuerpos dirigidos contra proteínas plasmáticas que unen fosfolípidos, con mayor frecuencia la β2-glicoproteína 1.
- γ Se desconoce el origen de los aAF, pero los estudios apoyan la hipótesis de que se originan en individuos susceptibles luego de exposición incidental a agentes del ambiente que inducen aAF.
- γ El mecanismo patogénico tampoco está completamente aclarado. Lo más probable es que involucre más de un mecanismo relacionado con inflamación y activación.
- γ Títulos bajos de aCL se observan en menos del 10% de los donadores de sangre y títulos moderados o altos de aCL o pruebas positivas de AL ocurren en menos del 1%.
- γ Las manifestaciones clínicas son variadas, cubren un espectro desde los casos asintomáticos hasta el SAF catastrófico.

BIBLIOGRAFÍA

- Asherson RA, Harris EN. Anticardiolipin antibodies: clinical associations. *Postgrad Med J* 1986; 62(734): 1081-1087
- Bertolaccini ML, Amengual O, Andreoli L, Atsumi T, Chighizola CB, Forastiero R, *et al.* 14th International Congress on Antiphospholipid Antibodies Task Force. Report on antiphospholipid syndrome laboratory diagnostics and trends. *Autoimmun Rev* 2014; 13(9): 917-930.
- Comarmond C, Cacoub P. Antiphospholipid syndrome: from pathogenesis to novel immunomodulatory therapies. *Autoimmun Rev* 2013; 12(7): 752-757.
- Conley CL, Hartmann C. A hemorrhagic disorder caused by circulating anticoagulants in patients with disseminated lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1952; 62: 416-430.
- de Groot PG, Urbanus RT, Derksen RH. Pathophysiology of thrombotic APS: where do we stand? *Lupus* 2012; 21(7): 704-707.
- de Groot PG1, Urbanus RT. The significance of autoantibodies against β 2-glycoprotein I. *Blood* 2012; 120(2): 266-274.
- Favaloro EJ. Variability and diagnostic utility of antiphospholipid antibodies including lupus anticoagulants. *Int J Lab Hematol* 2013; 35(3): 269-274.
- Feinstein DI, Rapaport SI. Acquired inhibitors of blood coagulation. *Prog Hemost Thromb* 1972. 1: 75-95.
- Giannakopoulos B, Krilis SA. The pathogenesis of the antiphospholipid syndrome. *N Engl J Med* 2013; 368(11):1033-44.
- Gillis D, Wong RC. Rarer clinical associations of antiphospholipid antibodies. *Semin Thromb Hemost* 2012; 38(4): 328-332.
- Hughes GR. Thrombosis, abortion, cerebral disease, and the lupus anticoagulant. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1983; 287(6399): 1088-1089.
- Hughes GRV, Harris EN, Gharavi AE. The anticardiolipin syndrome. *J Rheumatol* 1986; 13(3): 486-489.
- Meroni PL, Raschi E, Grossi C, Pregnolato F, Trespidi L, Acaia B, *et al.* Obstetric and vascular APS: same autoantibodies but different diseases? *Lupus* 2012; 21(7): 708-710.
- Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, *et al.* International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thrombosis Haemost* 2006; 4(2): 295-306.
- Nayer A, Ortega LM. Catastrophic antiphospholipid syndrome: a clinical review. *J Nephropathol* 2014; 3(1): 9-17.
- Oku K, Amengual O, Atsumi T. Pathophysiology of thrombosis and pregnancy morbidity in the antiphospholipid syndrome. *Eur J Clin Invest* 2012; 42(10): 1126-1135.
- Orfanakis A, Deloughery T. Patients with disorders of thrombosis and hemostasis. *Med Clin North Am.* 2013; 97(6): 1161-1180.
- Pengo V, Banzato A, Denas G, Jose SP, Bison E, Hoxha A, *et al.* Correct laboratory approach to APS diagnosis and monitoring. *Autoimmun Rev* 2013; 12(8): 832-834.
- Rand JH, Wolgast LR. Dos and don'ts in diagnosing antiphospholipid syndrome. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2012; 2012: 455-459.
- Reynaud Q, Lega JC, Mismetti P, Chapelle C, Wahl D, Cathébras P, *et al.* Risk of venous and arterial thrombosis according to type of antiphospholipid antibodies in adults without systemic lupus erythematosus: a systematic review and meta-analysis. *Autoimmun Rev* 2014; 13(6): 595-608.
- Rodríguez JL, Khamashta MA. Clinical advances of interest in the diagnosis and treatment of patients with antiphospholipid syndrome. *Rev Clin Esp* 2013; 213(2):108-113.
- Udayakumar N, Exhilar N, Rajendiran C. Primary antiphospholipid antibody syndrome: how certain can you be of the diagnosis? *J Clin Rheum* 2007; 13(1): 53.
- Wijetilleka S, Scoble T, Khamashta M. Novel insights into pathogenesis, diagnosis and treatment of antiphospholipid syndrome. *Curr Opin Rheumatol* 2012; 24(5): 473-481.
- Willis R, Pierangeli SS. Anti- β 2-glycoprotein I antibodies. *Ann N Y Acad Sci* 2013; 1285: 44-58.
- Willis R, Harris EN, Pierangeli SS. Pathogenesis of the antiphospholipid syndrome. *Semin Thromb Hemost* 2012; 38(4): 305-321.
- Wong RCW, Adelstein S, Gillis D, Favaloro E. Development of consensus guidelines for anticardiolipin and lupus anticoagulant testing. *Semin Thrombosis Hemost* 2005; 31(1): 39-48.

*Dra. Lidiette Salazar Palma
Dr. Rafael Jiménez Bonilla*

GENERALIDADES

Los problemas trombóticos constituyen una de las principales causas de morbilidad y mortalidad de la población del mundo entero. En los países occidentales representan más del 50% de las muertes de los adultos y la relevancia clínica de los diversos tipos de trombosis es mucho mayor que la de todas las enfermedades hemorrágicas juntas. Además, son una causa de relativa discapacidad. Después de un evento tromboembólico, los pacientes sufren secuelas físicas, mentales y emocionales.

El término trombosis significa la formación de una masa de fibrina o de plaquetas dentro de los vasos sanguíneos, la cual reduce la luz de los vasos y la velocidad de flujo. La formación de estos coágulos intravasculares es debida a la interacción de fenómenos vasculares, celulares y humorales, en un medio tan dinámico como la sangre circulante.

Durante el siglo XIX Virchow postuló que la pared vascular, el flujo sanguíneo y los componentes propios de la sangre eran los tres parámetros importantes en la patogenia de la trombosis. En la actualidad, se conocen además inhibidores y activadores de la coagulación sanguínea, así como el papel trascendental que juega el endotelio vascular en la regulación del fenómeno trombótico.

Los eventos trombóticos son de dos tipos: **venosos** y **arteriales**, los cuales presentan condiciones y una génesis completamente distintas.

Un trombo venoso se forma porque el proceso de la coagulación sanguínea se altera y pierde su regulación; por lo tanto, la coagulación se produce dentro de los vasos sanguíneos, dando origen a un coágulo igual a los que se forman cuando se ha producido una herida o un traumatismo. En cambio, los trombos arteriales se llegan a producir debido a la enfermedad aterosclerótica y al proceso inflamatorio, donde los vasos sanguíneos se llenan de placas de ateroma, compuestas entre otros elementos por células y capas de grasa, se lesiona el endotelio y las plaquetas se activan sobre esas placas y sobre el endotelio irregular, exactamente igual a como se activan en las rupturas

de un vaso sanguíneo. De esa forma, cual si fuera una herida, las plaquetas comienzan a adherirse y a agruparse, reduciendo de manera paulatina la luz del vaso. Luego se produce un coágulo en ese lugar, pero iniciado básicamente por las plaquetas.

Al trombo venoso se le conoce como *rojo*, por tratarse de un verdadero coágulo de fibrina atrapando eritrocitos, y al trombo arterial se le llama *blanco*, porque en su origen estuvo compuesto por plaquetas.

El resultado de cualquier tipo de trombo es la isquemia local que se produce y el riesgo de que se desprendan pequeños pedazos del trombo y causen embolización a distancia en aquellos territorios donde los vasos sanguíneos son muy pequeños.

Tanto la trombosis venosa como la arterial, aumentan con la edad (después de 40 años la posibilidad crece geométricamente) y con factores de riesgo (heredados o adquiridos), como podría ser la disminución congénita de uno o más inhibidores de la coagulación sanguínea o el incremento del mecanismo de la coagulación en distintas condiciones adquiridas o combinadas. A esa condición de tendencia a la trombosis es a la que se denomina trombofilia.

LA PARED VASCULAR

Para que se desarrollen fenómenos trombóticos, sobre todo de tipo arterial, es indispensable que haya pérdida de la integridad de la pared de los vasos sanguíneos, principalmente de la íntima, que incluye el endotelio y el subendotelio.

Como se citó en el capítulo de la hemostasia normal, el endotelio vascular posee funciones de tromborregulación, las cuales son importantes para mantener la sangre en estado de homeostasis. Además, el endotelio realiza funciones proagregantes plaquetarias, como la liberación del factor de von Willebrand o la producción del factor activador de las plaquetas (PAF), y actividades de antiagregación de las plaquetas, como la síntesis de prostaglandina y la liberación del óxido nítrico.

Por otra parte, el endotelio trabaja en la activación del

mecanismo de la hemostasia, liberando el factor tisular (FT) y el inhibidor del activador tisular del plasminógeno (PAI 1), y también realiza actividades anticoagulantes al activar la proteína C, al producir el inhibidor del FT (IFT) y al liberar el activador tisular del plasminógeno (tPA).

EL FLUJO SANGUÍNEO

Las arterias se caracterizan por alta presión intramural y por una alta velocidad de flujo, y en ellas la interacción de las plaquetas con el endotelio dañado representa el factor más importante en la aparición de trombosis. En cambio, las venas tienen baja presión y menor velocidad de flujo, y el estancamiento de la sangre y los estados de hipercoagulabilidad son los que conllevan a la trombosis.

La disminución del flujo sanguíneo por reposo postquirúrgico o por yesos o férulas aumenta la viscosidad sanguínea, y esto hace que la trombina no se diluya a concentraciones subcríticas, que el influjo de los inhibidores de la coagulación se retrase y que los factores activados de la coagulación no se aclaren en el hígado con la rapidez que deberían hacerlo. Todo eso hace que la sangre llegue a coagular dentro de las venas.

En las arterias, al estar disminuida la luz del vaso por la placa aterosclerótica y por las plaquetas adheridas a ella, el flujo sanguíneo se hace muy turbulento y los eritrocitos pueden romperse y liberar ADP, lo cual favorece que las plaquetas se adhieran más fácilmente al endotelio.

COMPONENTES DE LA SANGRE

El aumento de los factores de la coagulación, el descenso de los inhibidores de la hemostasia y la alteración de la fibrinólisis pueden influenciar la formación de un trombo.

Existen casos de tendencia trombótica familiar en pacientes que heredan un fibrinógeno anormal o una deficiencia congénita de antitrombina (AT), de proteína C o S, o que presentan mutación del factor V (Leiden) o del alelo 20210A de la protrombina. Estas son las más conocidas, porque también se han descrito otras alteraciones.

De todos los pacientes que desarrollan trombosis venosa profunda (TVP) a repetición, el 8,5% presentan deficiencia hereditaria de la proteína S, el 9% deficiencia hereditaria de proteína C, el 5% deficiencia hereditaria de AT y más del 40% constituyen casos con resistencia hereditaria a la proteína C activada (RPCA), que cursan con la mutación del factor V, cuya

variante se llama factor V Leiden. En Costa Rica el 2% de la población general es heterocigoto para el factor V Leiden, lo que significa que esas personas tienen 10 veces más riesgo que la población normal de presentar fenómenos trombóticos de tipo venoso. Los casos homocigotos de factor V Leiden presentan hasta 140 veces mayor posibilidad de desarrollar una TVP.

TROMBOSIS ARTERIAL

La aterosclerosis de la pared vascular, la ruptura de la placa de ateroma y el daño endotelial, exponen la sangre al colágeno y al factor tisular, lo que hace que las plaquetas se adhieran y se agreguen en el subendotelio. Posteriormente, el factor de crecimiento derivado de las plaquetas estimula la migración y proliferación de las células del músculo liso y de los fibroblastos en la íntima arterial, así como el nuevo crecimiento del endotelio. La reparación en el sitio del daño arterial y la incorporación del trombo resulta en una proliferación de la pared del vaso sanguíneo.

Así como la arteria se bloquea localmente, también pueden producirse émbolos de plaquetas y de fibrina, que conseguirían ocluir las arterias y arteriolas distales. Ejemplos de ello podrían ser los trombos de la carótida que conllevan a trombosis cerebral y a ataques isquémicos transitorios, y los trombos de las válvulas cardíacas que pueden llevar a émbolos sistémicos e infartos de miocardio.

Los factores de riesgo de las trombosis arteriales se relacionan con el desarrollo de aterosclerosis y se anotan en el Cuadro N° 1.

Cuadro N° 1. Factores de riesgo de aterosclerosis

Historia familiar positiva
Sexo masculino
Obesidad
Hiperlipidemia
Hipertensión
Diabetes mellitus
Gota
Policitemia
Hiperhomocisteinemia
Tabaquismo
Anormalidades en el electrocardiograma
Elevación del factor VII
Elevación del fibrinógeno
Presencia de anticoagulante lúpico
Enfermedades del colágeno
Enfermedad de Behçet

Lo importante es la identificación de ese tipo de pacientes, cuyo manejo es la modificación de hábitos y la disminución del riesgo. Gran cantidad de estudios,

basados en sexo, edad, presión arterial, niveles y fracciones del colesterol, intolerancia a la glucosa, fumado y análisis del electrocardiograma, se han diseñado para establecer niveles de riesgo de padecer una trombosis arterial. Por ejemplo, el estudio de Northwick demostró que los niveles elevados de factor VII y de fibrinógeno son fuertes indicadores predictivos independientes de eventos coronarios. Otro factor de riesgo determinado es la hiperhomocisteinemia.

TROMBOSIS VENOSA

Como se mencionó al inicio del capítulo, la tríada de

Virchow sigue teniendo vigencia: disminución del flujo sanguíneo, hipercoagulabilidad de la sangre y daño de la pared vascular.

El aumento de la coagulabilidad sistémica y la estasis son los principales protagonistas de los eventos vaso-oclusivos venosos, siendo la pared vascular mucho menos relevante que en la trombosis arterial, aunque los vasos pueden jugar un papel importante en los pacientes con sepsis o en los que utilicen catéteres.

En el Cuadro N° 2 se muestra una serie de factores de riesgo para trombosis venosa.

Cuadro N° 2. Factores de riesgo de trombosis venosa	
Deficiencias hereditarias	
Factor V Leiden Deficiencia de proteína C Deficiencia de proteína S Plasminógenos anormales	Variante de la protrombina G20210A Deficiencia de antitrombina Fibrinógenos anormales
Factores de riesgo adquiridos	
Aumento del factor VII Aumento de la homocisteína Anticonceptivos orales Embarazo y puerperio Trauma masivo Infarto de miocardio	Aumento del fibrinógeno Anticoagulante lúpico Trombocitopenia post heparina Cirugías (abdominal, de cadera) Cáncer Trombocitemia
Relacionada a estasis	
Falla cardíaca Inamovilidad prolongada Síndrome nefrótico Hiperviscosidad	Obstrucción pélvica Deshidratación Policitemia Várices y flebitis
Relacionada a factores desconocidos	
Edad Sepsis Enfermedad de Behçet	Obesidad Hemoglobinuria paroxística nocturna

Desórdenes hereditarios

La prevalencia de los desórdenes hereditarios asociados con riesgo de TVP es semejante a la de los desórdenes hereditarios de sangrado. Los casos de trombofilia hereditaria no deben ser investigados exhaustivamente en todos los pacientes con TVP, sino en los jóvenes que presenten trombosis a repetición, en casos de trombosis espontáneas o en sitios inusuales, en mujeres embarazadas que presenten trombosis y en pacientes que desarrollen trombosis mientras están anticoagulados.

Algunas de estas anomalías hereditarias se encuentran bien caracterizadas y se citan a continuación:

- *γ Mutación genética del factor V Leiden:* esta es la causa hereditaria más común de riesgo aumentado de TVP. Se presenta en aproximadamente el 4% de la población mundial, no encontrándose en los indios latinoamericanos ni en los japoneses, y viéndose en los griegos hasta en un 13%. Su descubrimiento se debió a que en 1993 Dalhback encontró que estos pacientes no prolongaban una prueba de TTP modificado, cuando se añadía proteína C activada al plasma del sujeto en estudio.

Debe recordarse que la proteína C activada (PCa) inactiva el factor Va normal, razón por la cual se le considera a la PCa como un inhibidor de la coagulación.

El factor V Leiden es una mutación genética en el gen del factor V, que sustituyó una arginina en la posición 506 por una glutamina, lo que lo hace resistente a ser destruido por la PCA. Como esta mutación es la principal causa hereditaria de trombosis venosa, debe investigarse obligatoriamente en los pacientes con las características citadas, y luego hacer un estudio de reacción de cadena de polimerasa (PCR) para comprobar si son heterocigotos u homocigotos.

Al igual que en todos los casos de TVP, el verdadero riesgo dependerá de la suma de distintos factores de riesgo. Aun en los casos homocigotos, no se recomienda la anticoagulación antes de presentar un fenómeno trombotico. Una pequeña proporción de los pacientes con resistencia a la proteína C activada no presentan el factor V Leiden, sino otro tipo de mutación del factor V.

- *Resistencia a la proteína C activada (RPCA):* la RPCA se ha encontrado en casi el 50% de los pacientes que presentan TVP y prácticamente en todos ellos se debe a la presencia del factor V Leiden. Dado que la prevalencia del factor V Leiden en la población mundial es relativamente alta (del 2% al 7% en la mayor parte de las sociedades), esta es la primera posibilidad que se debe estudiar en los casos de TVP. Cabe destacar que también se han descrito otras mutaciones del factor V.

En algunos casos de síndrome antifosfolipídico se observa que algunos anticuerpos interfieren con la inactivación del factor Va y se produce un estado adquirido de resistencia a la PCA.

- *Deficiencia de antitrombina (AT):* aunque este término fue utilizado por Morawitz desde 1906, posteriormente se describieron varias moléculas de la sangre con capacidad de neutralizar la trombina. En la actualidad, y de acuerdo a los comités internacionales de estandarización, solo se usa el término AT para describir al principal inhibidor fisiológico de la sangre.

La AT, descubierta como tal en 1965, inhibe la acción de la trombina cuando la heparina está presente. Aunque también lo hace cuando no hay heparina; en este caso la reacción es muy lenta. La AT forma un complejo estequiométrico 1:1 con la trombina, mediante la interacción de la arginina de

la AT con la serina de la trombina. Además, inhibe otros factores activados, como XIIIa, XIa, IXa, VIIIa, calicreínas y plasmina.

Por otra parte, la AT requiere de la heparina como cofactor para producir el efecto inhibitorio, por lo que los pacientes que presentan deficiencia de AT necesitan mayores dosis de heparina para obtener una anticoagulación adecuada.

La AT puede estar disminuida por causas adquiridas y en algunos pocos casos por causas hereditarias. Lo interesante de las deficiencias hereditarias es que estas pueden ser de dos tipos: las que tienen alterada la inhibición de la trombina y las que presentan una anormal unión con la heparina. En ambas condiciones pueden presentar deficiencias cuantitativas o funcionales, por medio de mutaciones de la molécula. Los casos que presentan alteración en la neutralización de la trombina son más severos que aquellos cuya anomalía se debe a la unión con la heparina.

Dentro de las condiciones adquiridas que cursan con deficiencia de AT se pueden citar la enfermedad hepática, la desnutrición severa, las pacientes que ingieren anticonceptivos orales, el síndrome nefrótico, la terapia con heparina, la etapa neonatal, entre otras. Sin embargo, la posibilidad de que una persona desarrolle una trombosis por deficiencia de AT dependerá de si ese paciente tiene otros factores de riesgo.

A pesar de que la deficiencia hereditaria de esta proteína es rara, se han encontrado múltiples variantes y, excepcionalmente, pacientes homocigotos, cuyos problemas tromboticos son muy serios; incluso, en ocasiones presentan trombosis arteriales desde edad muy temprana. Su herencia es autosómica dominante. Se pueden presentar deficiencias adquiridas por consumo aumentado, en hepatopatías, síndrome nefrótico y otras.

Las deficiencias de AT se determinan por métodos de neutralización de trombina, estimulación con heparina y métodos inmunológicos.

- *Cofactor II de la heparina:* solo inhibe a la trombina y no tiene acción sobre las otras serino proteasas, lo que lo distingue de la AT. El cofactor II de la heparina tiene importancia en la regulación de la actividad antitrombótica de las arterias medianas y grandes, debido a que en esos vasos el sulfato de dermatán comprende el 60-70% de la pared del endotelio, y este sulfato activa específicamente al cofactor II de la heparina.

- *Proteína C (PC)*: se sintetiza en el hígado y depende de la vitamina K, ya que tiene un ácido gamacarboxiglutámico en su molécula. Fue descubierta en 1976 y es un zimógeno que al activarse origina la proteína C activada (PCa), una proteasa de serina que hidroliza las formas activadas de los factores Va y VIIIa, regulando de esa manera la coagulación sanguínea.

Es interesante que la trombina activa normalmente la PC (aunque eso hace que no se vuelva a producir más trombina). Para que la velocidad de activación sea considerable, requiere de la trombomodulina, una proteína sintetizada en las células endoteliales. Una vez activada por el complejo trombina-trombomodulina, la PC pasa a circular en forma activa y destruye al factor Va y VIIIa. La PCa requiere de un cofactor, que es la proteína S, con lo que aumenta la velocidad de las reacciones de hidrólisis de los factores Va y VIIIa.

Las deficiencias congénitas de la PC condicionan cuadros de TVP, y la deficiencia homocigota hace que los niños mueran de púrpura fulminante en las primeras semanas de vida. La herencia es autonómica dominante con penetrancia variable. Los niveles de PC en los heterocigotos son de alrededor del 50% del valor normal. Muchos pacientes desarrollan necrosis de la piel cuando son tratados con warfarina (anticoagulante oral) por disminución del nivel de vitamina K.

Esta proteína se estudia en el laboratorio por métodos funcionales e inmunológicos. Una prueba muy importante, que llevó al descubrimiento del factor V Leiden, consiste en añadir PCa a un TTP específico, con el objeto de saber si la prueba se prolonga o no, dado que normalmente sí se prolonga.

- *Proteína S (PS)*: esta glicoproteína depende de la vitamina K, pero a diferencia de los otros factores K dependientes, la PS no es un zimógeno de una determinada proteasa de serina y no tiene acción sobre el factor Va ni sobre el factor VIIIa en ausencia de la PC. El 40% de la PS circula en forma libre, que es la forma activa, y el resto circula unida a una proteína inhibidora del sistema de complemento.

La deficiencia heterocigota se ha observado en jóvenes con trombosis a repetición y hasta el momento no se ha reportado ninguna deficiencia homocigota. Su herencia es autonómica dominante.

En el laboratorio se requiere hacer métodos funcionales e inmunológicos, pero es importante

medir la forma libre y la cantidad total de ella.

Los pacientes con esta deficiencia también muestran necrosis de piel al recibir warfarina.

- *Hiperhomocisteinemia*: los niveles altos de homocisteína pueden ser genéticos o por causa adquirida y están asociados con alto riesgo de trombosis, tanto arterial como venosa. Sin embargo, trabajos recientes no han demostrado que al bajar los niveles de homocisteína se reduzcan los riesgos trombóticos. La homocisteína se deriva de la metionina de la dieta.

La homocistinuria clásica es un desorden recesivo autonómico sumamente raro, generado por la deficiencia de la cistetion beta sintetasa, que causa enfermedad vascular y trombosis. Los casos heterocigotos se presentan en alrededor del 0,5% de la población general y cursan con un aumento moderado de la homocisteína. La hiperhomocisteinemia adquirida puede ser causada por deficiencia de folatos, vitamina B₁₂, vitamina B₆, daño renal y fumado.

- *Defectos del fibrinógeno*: algunas variantes de la molécula del fibrinógeno pueden cursar con trombosis, aunque la mayoría de ellas producen sangrado.
- *Aumento de factores*: el aumento del factor VII, VIII o del fibrinógeno puede estar asociado a trombosis arterial.
- *Alfa 2 macroglobulina*: esta glicoproteína regula la trombina y su nivel es importante sobre todo en niños, porque parece protegerlos sobre posibles estados de trombosis. Tal es el caso de los menores con síndrome nefrótico, en los cuales, a pesar de la pérdida urinaria de AT, la alfa 2 macroglobulina previene sobre posibles estados de TVP.

Lo relevante en cualquiera de estos casos es la asociación de varios factores de riesgo, que es lo que aumenta la incidencia de trombosis. Si se establece riesgo elevado, el médico deberá valorar la anticoagulación de los pacientes según esquemas que van desde meses hasta permanentes. Asimismo, el cambio de hábitos y control de medicamentos es fundamental.

- *Síndrome de las plaquetas pegajosas*: es un defecto congénito, autosómico dominante, de la agregación de las plaquetas, que causa hiperagregabilidad plaquetaria, la cual se manifiesta clínicamente por trombos arteriales, venosos y capilares. Muchas

veces pasa desapercibida o no se incluye en la evaluación de los pacientes. Se establece en estudio de agregometría plaquetaria en presencia de epinefrina y ADP, en los estudios de trombofilia.

Desórdenes adquiridos

Estos pueden causar trombosis por sí mismos, aunque lo establecido es que los pacientes que desarrollan trombosis tienen varios factores de riesgo. En el Cuadro N° 3 se citan algunas de las condiciones adquiridas que pueden cursar con trombosis.

Cuadro N° 3. Condiciones adquiridas que puede presentar trombosis
Edad, tabaquismo y otras drogas Posterior a cirugía Estasis venosa e inmovilidad Enfermedades malignas Inflamación Aumento de la viscosidad sanguínea Trombocitosis Ingesta de estrógenos y anticonceptivos orales Síndrome antifosfolípido Uso de concentrados del factor IX

DIAGNÓSTICO DE TROMBOSIS VENOSA

Trombosis venosa profunda

- *Sospecha clínica*: en los pacientes con cáncer, encamados o que hayan tenido TVP previamente, se puede sospechar trombosis si hay inflamación unilateral de una pierna, edema o la presencia de irrigación colateral no varicosa; el diagnóstico se confirma con estudios de imagen no invasivos y de laboratorio.
- *Ultrasonido*: este es el método más confiable para los pacientes que presentan una trombosis por primera vez en su vida. Se puede complementar con un Doppler, aunque este no distingue entre una trombosis aguda o crónica. La persistencia de obstrucción venosa detectada por ultrasonografía al finalizar el tratamiento con warfarina, se asocia con un riesgo aumentado de recaída trombótica.
- *Venografía de contraste*: este es el procedimiento más sensible y se reserva para aquellos pacientes con manifestaciones clínicas altamente sugestivas, pero con ultrasonografía negativa. Por medio de este procedimiento se determina el tamaño y la extensión del trombo. Este método es invasivo, doloroso y puede producir TVP como complicación.
- *Dímero D*: este método de laboratorio es el único que tiene alta sensibilidad y que, en caso de dar positivo, confirma la presencia de fibrina en el torrente circulatorio. Es muy útil en los casos de

trombosis de primera vez, para seguir la evolución, y cuando se sospecha una retrombosis (pero en conjunto con el resto de pruebas diagnósticas).

- *Resonancia magnética nuclear*: método muy útil, pero sumamente costoso.

Embolismo pulmonar

- *Sospecha clínica*: debe sospecharse en los pacientes con dolor pectoral, dificultad respiratoria, especialmente con historia previa de TVP, inmovilización por más de dos días o después de cirugía, hemoptisis o cáncer.
- *Rayos X del tórax*: a pesar de que a menudo es normal, puede mostrar infartos pulmonares o efusión pleural.
- *Perfusión ventilatoria por sentigrafía*: de esta manera se demuestran las áreas del pulmón que ventilan pero que no perfusan.
- *Angiografía pulmonar*: este es el método de referencia; sin embargo, es invasivo y puede presentar complicaciones como arritmias o reacciones al medio de contraste
- *Angiografía pulmonar por tomografía computarizada*: es un método excelente para visualizar las arterias pulmonares.
- *Resonancia magnética por angiografía pulmonar*: es un método muy bueno, pero muy costoso.

• γ Dímero D.**VALORACIÓN DEL RIESGO TROMBÓTICO: ESTRATIFICACIÓN**

Para estimar las medidas a tomar en un paciente, analizar el pronóstico de complicaciones y de retrombosis, elegir trombopprofilaxis o planear el esquema de tratamiento temporal o sostenido, se han establecido sistemas para calcular el riesgo tromboembólico.

Estos sistemas consideran grupos de parámetros como edad, comorbilidades del paciente, estilos de vida, hábitos, ingesta de medicamentos y los factores hemostáticos. Cada parámetro en esos grupos tiene una puntuación específica; se van sumando esos puntos y se establece el riesgo. Con base en esa cifra se hará el manejo, incluyendo la corrección de parámetros cambiables y esquemas de anticoagulación proporcionales en tiempo y tipos de medicamento, según ese riesgo establecido.

ESTUDIOS DE TROMBOFILIA

Desde el punto de vista práctico y económico, no es posible estudiar exhaustivamente a todos los pacientes que presenten eventos trombóticos. Los estudios de trombofilia deben realizarse solo en pacientes jóvenes o en aquellos con trombosis recurrentes, con tromboembolismos espontáneos, en sitios inusuales o desproporcionales a una situación basal, y en casos en que exista historia familiar de trombosis. También en aquellas mujeres que hayan presentado pérdidas fetales recurrentes u óbitos.

En el Cuadro N° 4 se citan las pruebas de laboratorio necesarias para estudiar los casos de trombofilia, recordando que todas ellas son importantes. Por su alta prevalencia en la población general, el factor V Leiden no debe dejar de investigarse. Además, es fundamental cumplir las condiciones adecuadas de estudio: menores de 45 años, libres de anticoagulación y en período no agudo del evento, a las 12 semanas de ocurrido (mínimo ocho semanas).

Cuadro N° 4. Pruebas de laboratorio para el estudio de trombofilia

- Hemograma completo, VES.
- Descartar enfermedad mieloproliferativa en frotis sanguíneo.
- TP, TTPa, dímero D.
- Fibrinógeno, tiempo de trombina.
- Anticoagulante lúpico (en pacientes con TTP prolongado).
- Anticuerpos IgG e IgM anticardiolipinas.
- Resistencia a la proteína C activada.
- Análisis de ADN para factor V Leiden.
- Antitrombina.
- Proteínas C y S.
- Homocisteína en plasma.
- Anticuerpos monoclonales CD59 y CD55 en eritrocitos (para HPN).
- Factor VIIIc.

TRATAMIENTO

Los anticoagulantes son los medicamentos de elección en los casos de eventos tromboembólicos venosos, aunque su utilidad en trombosis arteriales está también indicada.

Existen dos tipos de anticoagulantes: la heparina, un mucopolisacárido que neutraliza la trombina, y los anticoagulantes orales, que evitan la fijación de calcio en los factores dependientes de la vitamina K (II, VII, IX y X).

La heparina requiere de la antitrombina (es su cofactor) y juntas forman un complejo. La acción de la antitrombina neutraliza la trombina, así como los factores Xa, IXa y XIa.

La heparina se inactiva en el hígado y se excreta por la orina. En general, se puede usar en forma completa (sin fraccionar) con un peso molecular de 15.000 a 18.000 daltons, o de manera fraccionada con un peso molecular de 2.000 a 10.000 daltons (heparinas de bajo peso molecular -HBPM-). Esta última forma inhibe principalmente al factor Xa y no a la trombina, e interacciona menos con las plaquetas que la heparina convencional, lo que resulta en un menor riesgo de sangrado. La heparina de bajo peso molecular tiene mejor biolabilidad y su vida media plasmática es más prolongada que la heparina no fraccionada. Esto hace que pueda aplicarse una vez al día y es muy útil también en profilaxis.

La heparina no fraccionada se utiliza rutinariamente en TVP, embolismo pulmonar y como terapia inicial. En dosis menores se utiliza en la prevención de los fenómenos trombóticos de tipo venoso. También las HBPM han aumentado su utilización actual.

En embarazadas que requieren anticoagularse, sólo se utiliza HBPM, debido a que esta clase de heparina no cruza la placenta ni es teratogénica.

La heparina convencional es el anticoagulante usado en las cirugías a corazón abierto, porque su potencia se puede neutralizar relativamente fácil por medio del sulfato de protamina.

Los anticoagulantes orales derivan de la cumarina o de la indandiona, y la warfarina es la más utilizada. Son antagonistas de los factores K dependientes, bloqueando la carboxilación del ácido glutámico de esos factores. Según la vida media de esos factores, el factor VII funcional baja dentro de las primeras 12 horas, por lo que su acción es muy rápida. Sin embargo, como la reducción del factor II (protrombina) es más lenta, la anticoagulación completa se consigue hasta el tercer o quinto día de recibir warfarina. Es importante tener presente que su acción puede revertirse aplicando vitamina K oral o parenteral.

Cabe mencionar que existe gran cantidad de alimentos y medicamentos que pueden interferir con la acción de los anticoagulantes orales, potenciando o disminuyendo su acción.

Otra forma de tratamiento de las trombosis, sobre todo las arteriales, es el uso de agentes fibrinolíticos que lisan el coágulo, como la estreptoquinasa. Esas drogas se usan sistemáticamente en los infartos de miocardio, en embolismo pulmonar masivo o en trombosis íleo-femoral, y localmente se aplican a pacientes con oclusión periférica arterial. En los últimos años han aparecido algunos otros agentes en forma recombinante, como es el caso del tPA (activador tisular del plasminógeno), que consigue lisar el coágulo con menor activación sistémica del mecanismo de fibrinólisis.

Los antiagregantes plaquetarios son los medicamentos de elección en los problemas vaso-oclusivos de tipo arterial. En la actualidad está bien establecida la utilidad de la aspirina en la prevención de la enfermedad vascular secundaria, y existe gran cantidad de medicamentos con diferentes formas de acción sobre las plaquetas, incluyendo anticuerpos monoclonales sobre las glicoproteínas plaquetarias de membrana.

BIBLIOGRAFÍA

Alcántar- Luna E, Carrillo-Esper R, Herrera-Cornejo MA, Jaimovich D, López-García L, Ramos-Corrales MA, *et al.* Guía de práctica clínica de profilaxis y manejo de la enfermedad tromboembólica de pacientes hospitalizados, basada en indicadores medibles de calidad hospitalaria. *Med Int Mex* 2011; 27(4): 356-369.

Altman R. Trombosis. Fisiología, mecanismos de enfermedad y tratamiento. Argentina: Editorial Akadia; 2005.

Baglin T, Barrowcliffe TW, Cohen A, Greave M. Guidelines on the use and monitoring of heparin. *Br J Haematol* 2006; 133(1): 19-34.

Baglin TP, Keeling DM, Watson HG. Guidelines on oral anticoagulation (warfarin). Third edition -2005 update. *Br J Haematol* 2006; 132(3): 277-285.

Bates SM, Weitz JI. The status of new anticoagulants. *Br J Haematol* 2006; 134(1): 3-19.

Hoffbrand AV, Moss PAH, Pettit JE. *Essential haematology*. 5 ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 2006.

Kyrle PA, Eichinger S. Deep vein thrombosis. *Lancet* 2005; 365(9465): 1163-1174.

Moncada B, Ruíz-Arguelles GJ, Castillo-Martínez C. The sticky platelet syndrome. *Hematology* 2013; 18(4): 230-232.

Wells PS, Anderson DR, Rodger M, Forgie M, Kearon C, Dreyer J, *et al.* Evaluation of D-dimer in the diagnosis of suspected deep-vein thrombosis. *N Engl J Med* 2003; 349: 1227-1235.

Williams W, Beutler E, Kipps TJ, Coller BS Casascelli C. *Williams: hematología*. 6 ed. Reimpresión. Madrid: Marbán Libros S.L.; 2007.

ADMINISTRACIÓN Y CONTROL DE LA ANTICOAGULACIÓN, DE LOS FIBRINOLÍTICOS Y DE LOS ANTIAGREGANTES PLAQUETARIOS

Dra. Lidiette Salazar Palma
Dr. Rafael Jiménez Bonilla

GENERALIDADES

Desde hace varias décadas, el campo de la terapéutica antitrombótica ha demandado un buen control de laboratorio por varias razones. Primero, porque la anticoagulación implica el riesgo de presentar serios problemas de sangrado, e incluso morir por esa causa; además, porque diversos grupos de pacientes, con distintas condiciones patológicas, en ocasiones complicadas, requieren de esa terapia; y, finalmente, porque la oferta de anticoagulantes, antiagregantes y otros ha ido ampliándose y se requiere uniformar criterios de seguimiento sobre ellos.

En el caso de la anticoagulación oral, a través del TP y de la estandarización mundial de las tromboplastinas utilizadas en esta prueba, se llevó a cabo un proyecto gigantesco en el que trabajaron tanto la Organización Mundial de la Salud (OMS) como la Unión Europea (UE), las cuales organizaron centros de referencia donde se establecieron los rangos de seguridad para el uso de los anticoagulantes orales, que terminaron con la creación de un índice internacional estandarizado conocido como INR.

Por otra parte, con las heparinas no fraccionadas controladas por TTPa y con el uso creciente de las heparinas de bajo peso molecular (fraccionadas), se consiguió que se realizaran también estudios para comprobar si era o no necesario el control de laboratorio de esas nuevas heparinas.

En ese contexto, tanto el uso de agentes fibrinolíticos como el de los antiagregantes plaquetarios, le dieron una nueva perspectiva de éxito al manejo de trombosis arteriales y a su prevención, por lo que es importante darle seguimiento a estos fármacos.

HEPARINAS

La heparina no fraccionada

La administración de la heparina convencional se realiza por vía intravenosa, por aplicaciones cada cuatro o seis horas, aunque puede hacerse en forma continua, con un control exacto de la infusión, como se

describe en las siguientes líneas.

- *Administración continua:* esta permite una mejor dosificación y paralelamente, un mejor control de laboratorio. En estos casos, el control debe hacerse para asegurar una adecuada protección, evitando hipo o sobreanticoagulación. Con esos controles, el ajuste de dosis es muy ágil, sobre todo en pacientes quirúrgicos y otros hospitalizados. En casos de sobreanticoagulación se puede suspender la infusión o neutralizar el medicamento con sulfato de protamina.

La administración continua es el método de aplicación de la heparina en las embolias pulmonares agudas, en la trombosis venosa profunda (TVP) y en otras situaciones, como en aquellas en las que se usa como primera medicación, con una dosis permanente y rápida de anticoagulante, mientras se establece la posterior medicación oral.

Cabe destacar que en algunos casos clínicos se observa que los pacientes con enfermedad coronaria aguda reciben al mismo tiempo heparina convencional (o heparina de bajo peso molecular) y aspirina como antiagregante plaquetario, con el fin de evitar trombosis mural, embolización sistémica y TVP. Todo esto complica a veces el control de laboratorio de la terapéutica con heparina.

- *Administración discontinua:* este tipo de administración (cada cuatro o seis horas) tiene el problema de que si el control de laboratorio se realiza poco después de la aplicación de la heparina, el resultado será muy diferente al obtenido después de varias horas de haber sido administrado el anticoagulante. Por lo tanto, el control de laboratorio de los casos de infusión discontinua debe hacerse siempre una hora antes de la siguiente dosis. De esta forma, los resultados serán siempre comparables unos con otros.
- *Administración subcutánea:* cuando se utiliza de manera profiláctica, la heparina no fraccionada se aplica vía subcutánea, cada 12 horas, y usualmente no se requieren controles.

En cualquiera de los casos, el monitoreo de la heparina se realiza por medio del TTPa, el cual debe estar prolongado de dos a tres veces el valor basal del paciente antes de empezar la anticoagulación. Los esquemas terapéuticos en muchos de los pacientes que reciben heparina, introducen -a los dos días- simultáneamente la anticoagulación oral, suspendiéndose la heparina cuando el INR llega a estar sobre 2,0 en dos días consecutivos.

La heparina fraccionada

La heparina de bajo peso molecular (HBPM) se aplica en inyecciones subcutáneas y, como tiene una vida media más prolongada que la heparina convencional, puede darse una vez al día cuando se utiliza en forma profiláctica, y una o dos veces al día cuando se usa como tratamiento. Cuando se compara con la heparina estándar, la fraccionada tiene una respuesta previsible con relación a la dosis y, por lo tanto, no requiere monitoreo rutinario por parte del laboratorio, excepto en

niños, en pacientes muy obesos o de muy bajo peso, en mujeres embarazadas, en casos de malignidad o en falla renal. En los últimos tres grupos es el fármaco de elección.

Este tipo de heparina conlleva un menor riesgo de trombocitopenia o de osteoporosis y es el tratamiento de prevención de las TVP. En la actualidad se utiliza mucho para el tratamiento de embolias pulmonares y en el evento coronario agudo en general.

En los pacientes que requieren control de laboratorio, la prueba que se utiliza es el nivel de anti-factor Xa, prueba que debe realizarse cuatro horas después de la inyección subcutánea. Los niveles profilácticos varían entre 0,1-0,3 UI/ml de anti Xa, y los de tratamiento entre 0,5-1,0 UI/ml.

En el Cuadro N° 1 se describen las principales diferencias entre los dos tipos de heparinas.

Cuadro N° 1. Características de la heparina no fraccionada y la fraccionada (HBPM)		
	Heparina no fraccionada	HBPM
Promedio PM (kilodaltons)	15	4,5
Anti-Xa: anti IIa	1:1	2:1 a 4:1
Inhibición de plaquetas	Sí	No
Biodisponibilidad	50%	100%
Vida media intravenosa	1 hora	2 horas
Vida media subcutánea	2 horas	4 horas
Eliminación	renal y hepática	Renal
Control de laboratorio	TTP	Anti-Xa
Trombocitopenia inducida	Alta	Baja
Osteoporosis	Sí	Menos frecuente

Complicaciones

La heparina no fraccionada -HNF- tiene un alto riesgo de sangrado, el cual puede ser fatal en cerca del 2% de los casos. Todas las complicaciones de la HNF se reducen a más del 50% con el uso de la heparina de bajo peso molecular HBPM.

Como la HNF tiene una vida media de menos de una hora, en la mayoría de los casos de sangrado excesivo lo único que se hace es suspender la medicación. Solo en muy pocos casos se utiliza la neutralización

con sulfato de protamina, dado que el exceso de este medicamento también podría producir sangrado.

Otra de las complicaciones de la terapéutica con heparina es la trombocitopenia, que puede presentarse a los siete días de iniciada la terapia, aunque por lo general es leve. En el 5% de los pacientes con HNF pueden presentarse trombocitopenias importantes y -paradójicamente- estos casos cursan con trombosis. En ocasiones el diagnóstico de trombocitopenia inducida por heparina no es fácil, pero debe considerarse en todo paciente que reciba HNF. En

estos casos se debe detener el tratamiento. Las HBPM casi no presentan trombocitopenia.

La osteoporosis también es otra de las complicaciones de la heparina. Esta se produce en aquellos pacientes que la reciben por largos períodos de tiempo.

Por otra parte, debe recordarse que posteriormente, al incorporar la warfarina, esta puede producir necrosis en piel si el paciente es deficiente en proteína C o S.

ANTICOAGULANTES ORALES

Los anticoagulantes orales derivan de la cumarina y de la indantiona, y la warfarina es la de mayor uso.

Los pacientes que reciben warfarina tienen diferencias individuales muy marcadas en la anticoagulación, debido a la absorción, la distribución, el metabolismo y la eliminación. Con frecuencia, la warfarina se une a ciertas proteínas plasmáticas; además, puede presentar interferencia por otros medicamentos y por efecto de la dieta, todo lo cual complica su manejo.

La combinación de dieta libre de vitamina K 1 con antibióticos orales puede prolongar el TP, debido a la supresión de factores dependientes de la vitamina K. Como estos factores se producen en el hígado, la hepatopatía también afecta en gran medida esta anticoagulación.

Pero lo que más afecta a la respuesta de los anticoagulantes orales es la interacción con otros fármacos, sobre todo los que tienen mucha afección por la albúmina, como los AINES (anti-inflamatorios no esteroideos).

Los anticoagulantes orales están contraindicados en hipertensión arterial, enfermedad hepática severa, diátesis hemorrágicas, úlcera péptica, alcoholismo, embarazo o pobre adhesión del paciente al tratamiento. Este tipo de anticoagulación debe retirarse por lo menos cinco días antes de la realización de procedimientos invasivos, para lograr un INR inferior a 1,5.

Se han reportado pacientes con resistencia genética a la warfarina, o metabolizadores lentos que requieren dosis ajustadas para conseguir una anticoagulación adecuada.

El control de laboratorio

El objetivo del tratamiento con los anticoagulantes orales es obtener un efecto balanceado entre la protección antitrombótica eficaz y la prevención del sangrado. Como ya se dijo, la gran variabilidad de un

individuo a otro y la necesidad de que exista un método de laboratorio fidedigno, que pueda ser comparado entre distintos laboratorios, han generado múltiples estudios para poder definir con certeza los niveles seguros de anticoagulación oral.

Un aspecto que es necesario tener presente, es que millones de personas en el mundo reciben este tipo de anticoagulantes y, por lo tanto, los laboratorios de los centros asistenciales de adultos poseen un volumen creciente de estos controles, los cuales aplican a los pacientes seguidos en sus clínicas de anticoagulación.

Además, es importante conocer que tras varios esfuerzos se logró obtener una tromboplastina que pudiera servir de referencia, dado que cada fabricante las obtiene de distintos tejidos u órganos, lo que le da a cada tromboplastina una sensibilidad muy diferente. Algunas detectan muy mal las dosis bajas de anticoagulante y otras fallan en determinar las dosis altas. Por tal motivo, los comités de estandarización de las sociedades internacionales de hematología y de hemostasia y trombosis, dictaron pautas para que los resultados del TP se reporten como una relación (razón) entre los segundos del paciente y los segundos del control.

De esta forma, se creó una razón que posteriormente se modificó de acuerdo con el ISI (Índice de **Sensibilidad** Internacional) del reactivo. En la actualidad, cada compañía que produce tromboplastina incluye en sus indicaciones el ISI de su propio reactivo.

El siguiente paso que se produjo fue relacionar esas tromboplastinas (de diferente sensibilidad) con una tromboplastina mundial de referencia, de donde salió el INR (*International Normalized Ratio*). Al respecto, es importante mencionar que el INR es una razón mundial estandarizada, que solo debe ser utilizada por el médico para los pacientes que estén recibiendo anticoagulantes orales.

Los instrumentos automatizados calculan siempre el INR en todos los pacientes, por lo que debe adecuarse el formato de reporte, para que este resultado se anote exclusivamente en los pacientes anticoagulados con warfarina.

En la práctica clínica se trata de mantener a los pacientes con INRs entre 2,0 y 3,0 para los casos de tratamiento de las TVP, embolismo pulmonar, fibrilación atrial, TVP recurrente después de warfarina, trombofilia hereditaria sintomática, cardiopatías, trombosis mural y cardioversión. Para los individuos con TVP que hacen una recaída trombótica mientras están con warfarina, así como los casos con válvulas cardíacas mecánicas

y algunas personas con síndrome antifosfolípido, la idea es mantenerlos con INRs entre 3,0 y 4,0.

Debe enfatizarse que la warfarina cruza la placenta y que además es teratogénica, por lo que se evita durante el embarazo. Muchos pacientes son sujetos de anticoagulación oral de por vida. En todos ellos es necesario asegurarles un buen control de laboratorio.

Interacción con otros medicamentos

Alrededor del 97% de la warfarina se une en la circulación a la albúmina, y solo una pequeña porción circula de forma libre y penetra las células del parénquima hepático. Precisamente, esta porción libre es la que actúa de manera activa. Los fármacos que afectan la unión de la warfarina con la albúmina, los que alteran su excreción o los que disminuyen la absorción de la vitamina K en el intestino, interfieren bastante con la acción y el control de la anticoagulación oral. Estos parámetros se resumen en Cuadro N° 2.

Cuadro N° 2. Factores que afectan la potencia de los anticoagulantes orales	
Potencialización	Inhibición
- Sulfonamidas. - Cimetidina. - Alopurinol. - Antidepresivos tricíclicos. - Tiroxina. - Quinidina. - Altas dosis de salicilatos. - Algunas cefalosporinas. - Enfermedad hepática. - Mala absorción, terapia con antibióticos, laxantes.	- Barbitúricos. - Rifampicina. - Anticonceptivos orales. - Embarazo. - Dieta rica en vitamina K. - Resistencia hereditaria a los anticoagulantes orales.

Uno de los grandes problemas del manejo de los anticoagulantes orales son las dosis excesivas y la administración durante las cirugías. Para esas situaciones, el laboratorio debe realizar un monitoreo muy estrecho de la anticoagulación.

En los casos con un INR de 4,5 o superior sin sangrado, la warfarina debe detenerse de inmediato por uno o dos días, y volver a ajustar el INR al nivel deseado. En los pacientes con un INR superior a 8,0 sin sangrado, debe aplicarse una dosis oral de vitamina K de 0,5 a 2,5 mg.

En los pacientes que presenten sangrado severo debe suspenderse la medicación, dar vitamina K y suministrar también plasma fresco congelado o concentrados de protrombina. Debe recordarse que la vitamina K es el antídoto de estos casos y que se puede dar por vía oral o intravenosa. Sin embargo, el uso de altas dosis de esta hará que se produzca una futura resistencia a la warfarina, que puede durar hasta siete días.

Durante las cirugías menores, la warfarina no se suspende, pero se recomienda hacer enjuagues bucales de ácido epsilón aminocaproico (Amicar). Para

las cirugías mayores debe suspenderse la warfarina, hasta obtener un INR menor a 1,5, y luego suministrar heparina de bajo peso molecular.

En los últimos años se han desarrollado varios anticoagulantes orales dirigidos hacia el factor Xa, y otros hacia la trombina -IIa-, cuyo uso ya tiene aprobadas algunas aplicaciones clínicas. De estos anticoagulantes todavía no hay antídoto en caso de complicaciones, ni tampoco pruebas de seguimiento por el laboratorio, porque aún están en proceso de investigación.

AGENTES FIBRINOLÍTICOS

Así como hay fibrinolíticos que son bien conocidos, existen otros más novedosos, gracias a que en la actualidad se están produciendo agentes por medio de tecnología de ADN, que no permiten que los pacientes se infecten con virus u otros agentes infecciosos.

Estos tratamientos son rutinarios en personas con infartos de miocardio y con embolismos pulmonares, así como en aquellos que desarrollan cuadros agudos de oclusiones arteriales. La administración y las dosis están muy bien establecidas dependiendo del agente

que se utilice, pero su mayor éxito se alcanza cuando la terapéutica comienza dentro de las seis horas posteriores al episodio agudo. Sin embargo, se ha visto que su uso es beneficioso aun dentro de las 24 horas siguientes al problema.

Tal vez el trombolítico más usado es la estreptoquinasa, la cual se da en dosis de hasta 1.500.000 unidades por hora en caso de los infartos de miocardio, añadiéndole posteriormente terapia con aspirina.

Otros agentes que se utilizan son la uroquinasa y el activador tisular del plasminógeno (recombinante). En la actualidad no es usual el control de laboratorio de estos pacientes, pero podría hacerse con niveles de fibrinógeno.

DROGAS ANTIPLAQUETARIAS

En el presente, los antiagregantes plaquetarios constituyen uno de los fármacos más utilizados en medicina. La primera que se conoció fue la aspirina, y desde entonces se han tratado de descubrir nuevos medicamentos y de establecer las dosis adecuadas para evitar el reinfarto de miocardio y la recaída de diversos problemas vaso-oclusivos de tipo arterial. Cada uno de estos medicamentos tiene diferente modo de acción en el ciclo del ácido araquidónico, el cual se realiza tanto en el endotelio vascular como dentro de las plaquetas.

- *Aspirina*: este antiinflamatorio inhibe la ciclo-oxigenasa de las plaquetas en forma permanente; es decir, durante toda la vida de las plaquetas (siete días) y, por lo tanto, reduce la producción de tromboxano A_2 . La inhibición de la ciclo-oxigenasa del endotelio es menos sensible a su acción y así se logra producir en el vaso sanguíneo alguna cantidad de prostaciclina, la cual es *per se* un antiagregante plaquetario y un vasodilatador. Las dosis bajas son más efectivas que las dosis altas para obtener un buen efecto antitrombótico arterial, al permitir que se produzca algo de prostaciclina.

La aspirina se usa en pacientes con enfermedad coronaria y en enfermedad cerebrovascular. También puede prevenir trombosis en aquellos casos que cursan con trombocitosis.

- *Dipiridamol (persantín)*: esta droga es un inhibidor de la fosfodiesterasa, y ha demostrado ser exitosa en los pacientes con válvulas cardíacas prostéticas y en las operaciones de corazón abierto.

- *Ticlopidina*: se ha usado después de angioplastia coronaria. Como efectos adversos tiene la neutropenia o trombocitopenia. Prácticamente ha sido sustituida por el clopidogrel, excepto en aquellos casos en que existe intolerancia a este medicamento.

- *Clopidogrel*: es un antagonista del receptor del difosfato de adenosina y se usa en eventos isquémicos cerebrales, en infarto de miocardio y en enfermedad vascular periférica.

- *Inhibidores del receptor de la glicoproteína IIb/IIIa (abciximab, eptifibatida, tirobifano)*: estas drogas son anticuerpos monoclonales que se utilizan junto con heparina y aspirina en algunos pacientes con angioplastias coronarias, pero solo pueden usarse por una única vez, pues causan resistencia inmunológica.

- *Prostaciclina*: experimentalmente se ha comenzado a usar de manera intravenosa en pacientes con enfermedad vascular periférica y en casos de púrpura trombótica trombocitopénica.

Ninguno de estos medicamentos antiplaquetarios requiere control de laboratorio en forma rutinaria, pero en caso de requerirse, las pruebas son las de agregación en plaquetas frescas con diferentes agonistas o agregación plaquetaria en sangre total mediante el método BASIC, que es una prueba medida por el método de impedancia.

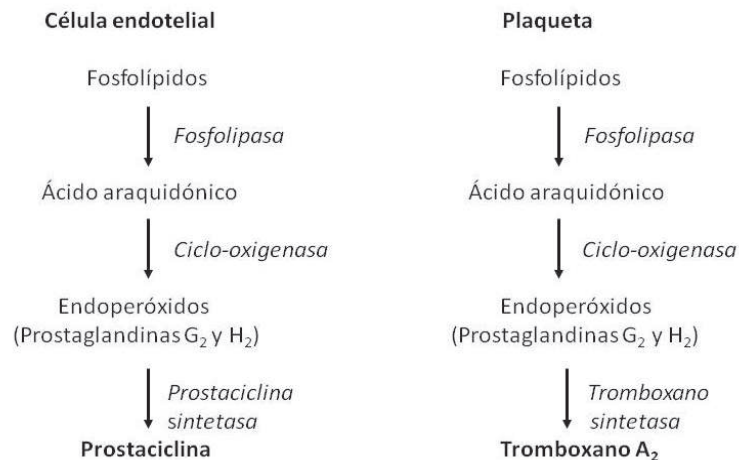


Figura N° 1. Esquema del ciclo del ácido araquidónico en la plaqueta y en las células endoteliales. Se observa el sitio de acción de algunos antiagregantes plaquetarios. Debido a la diferencia de la sintetasa, el producto final en cada caso es distinto. La prostaciclina es un vasodilatador que inhibe la agregación plaquetaria, mientras que el tromboxano A₂ es un vasoconstrictor que promueve la agregación de las plaquetas.

BIBLIOGRAFÍA

Altman R. Trombosis. Fisiología, mecanismos de enfermedad y tratamiento. Argentina: Editorial Akadia; 2005.

Baglin TP, Keeling DM, Watson HG. Guidelines on oral anticoagulation (warfarin). 3 ed. - 2005 update. Br J Haematol 2006; 132: 277-285.

Funk D. Coagulation assays and anticoagulant monitoring. ASH Education Book 2012; 2012(1): 460-465.

Hoffbrand AV, Moss PAH, Pettit JE. Essential haematology. 5 ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 2006.

Kyrle PA, Eichinger S. Deep vein thrombosis. Lancet 2005; 365(9465): 1163-1174.

Rodak B. Hematología, fundamentos y aplicaciones clínicas. 2 ed. Buenos Aires: Editorial Panamericana; 2004.

Schulman S. Clinical practice. Care of patients receiving long-term anticoagulant therapy. N Engl J Med 2003; 349(7): 675-683.

Tripodi A, van den Besselaar A. Laboratory monitoring of anticoagulation: where do we stand?. Semin Thromb Hemost 2009; 35(1): 34-41.

HEMATOLOGÍA ANALÍTICA

TOMO II
LABORATORIO

6 EDICIÓN

EDITOR CIENTÍFICO
GERMAN SÁENZ RENAULD

COORDINADORES EDITORIALES
BERTA E. VALVERDE ROJAS
WALTER RODRÍGUEZ ROMERO



WH100
H487he6 Hematología Analítica / Editor German F. Sáenz
Renauld. -- 6° ed. -- San José, C. R.:
EDNASSS-CCSS, 2016.
2 v. : 706 p. ; il. ; 21.6 x 27.9 cm.
ISBN: 978-9968-916-58-5

1. HEMATOLOGÍA. 2. SANGRE. 3. ENFERMEDADES
HEMATOLÓGICAS. I. Sáenz Renauld, German F., Editor

La publicación de la sexta edición de esta obra fue aprobada por el Consejo Editorial de EDNASSS, en la sesión N° 147, del 19 de noviembre de 2014.

Levantado de texto: los autores.

Diseño portada: Alexander Alvarado Madrigal

Artes e impresión: M&RG Diseño y Producción Gráfica, S.A.

Primera edición: 1981- Universidad de Costa Rica.

Segunda edición: 1987- Universidad de Costa Rica.

Tercera edición: 1995- Editorial Nacional de Salud y Seguridad Social (EDNASSS).

Cuarta edición: 2003- Editorial Nacional de Salud y Seguridad Social (EDNASSS).

Quinta edición: 2008- Editorial Nacional de Salud y Seguridad Social (EDNASSS).

Sexta edición: 2016 - Editorial Nacional de Salud y Seguridad Social (EDNASSS).

©Editorial Nacional de Salud y Seguridad Social (EDNASSS) 2016.

Centro de Desarrollo Estratégico e Información en Salud y Seguridad Social.

Caja Costarricense de Seguro Social (CCSS).

Teléfono: 2221-6193. Fax: 2233-8359

Correo electrónico: ednasss@ns.binasss.sa.cr

EDNASSS: una editorial al servicio de la salud y la seguridad social

EDITORES Y AUTORES INVITADOS

Dr. German F. Sáenz Renauld
Editor científico

Microbiólogo Químico Clínico (MQC), especialista en Hematología, Msci. Catedrático jubilado, Cátedra de Hematología. Exdirector del Departamento de Análisis Clínicos, exdirector de la Cátedra de Hematología, Departamento de Análisis Clínicos, Facultad de Microbiología, exdirector y asesor científico del Centro de Investigación en Hemoglobinas Anormales y Trastornos Afines (CIHATA), Vicerrectoría de Investigación, Universidad de Costa Rica (UCR).

Dra. Berta Valverde Rojas
Coordinadora editorial

MQC, especialista en Hematología, UCR. Profesora invitada, Cátedra de Hematología, Departamento de Análisis Clínicos, Facultad de Microbiología. Profesora del Sistema de Estudios de Postgrado, Universidad de Costa Rica. Subjefa del Laboratorio de Investigación, Hospital Nacional de Niños, Caja Costarricense de Seguro Social (CCSS).

Dr. Walter E. Rodríguez Romero
Coordinador editorial

MQC, especialista en Hematología. Profesor asociado, Cátedra de Hematología, Departamento de Análisis Clínicos, Director del Departamento de Análisis Clínicos, Facultad de Microbiología. Exdirector del CIHATA, Vicerrectoría de Investigación. Profesor del Sistema de Estudios de Postgrado, UCR.

Dr. Rafael Jiménez Bonilla
Coeditor

MQC, MSc, catedrático, Cátedra de Hematología, Departamento de Análisis Clínicos, Facultad de Microbiología. Exprofesor del Sistema de Estudios de Postgrado, UCR. Exdirector del Laboratorio de Investigación y de la Unidad de Bioética e Investigación, Hospital Nacional de Niños, CCSS.

Dra. Lidiette Salazar Palma
Coeditora

MQC, especialista en Hematología, Universidad de Costa Rica. Profesora invitada de la Cátedra de Hematología UCR; profesora de la Facultad de Medicina, UCR. Jefa del Laboratorio del Servicio de Hematología, Hospital Calderón Guardia, CCSS.

Dra. Sandra Boza Oreamuno

MQC, UCR. Profesora instructora, Cátedra de Hematología, Facultad de Microbiología, UCR.

Dr. Walter Cartín Sánchez

MQC, especialista en Hematología, UCR. Director del Laboratorio de Estudios Especializados e Investigación, Hospital Nacional de Niños, CCSS.

Dr. Jorge Elizondo Almeida

Médico infectólogo, UCR. Máster en Salud Pública, Universidad de Miami. Profesor del Sistema de Estudios de Postgrado, Escuela de Medicina, UCR. Médico asistente, especialista. Cátedra y Servicio Dermatología-Alergología, Hospital México, CCSS.

Dr. Jorge Fonseca González

MQC, inmunólogo. Profesor del Sistema de Estudios de Postgrado, UCR. Jefe del Laboratorio de Inmunología, Hospital México, CCSS.

Dra. Melissa Granados Zamora

MQC, especialista en Hematología, UCR. Profesora instructora, Cátedra de Hematología, Facultad de Microbiología, UCR.

Dr. Evan Jensen Gamboa	MQC, especialista en Hematología, UCR. Suficiencia investigadora, Universidad de Salamanca. Profesor del Sistema de Estudios Postgrado, UCR. Citometrista certificado por la <i>International Cytometry Certification Examination</i> (ICCE).
Dra. María Paz León Bratti	Médico especialista en Medicina Interna e Inmunología Clínica, Hospital México, CCSS. Profesora de la Cátedra de Medicina de la Facultad de Medicina, UCR.
Dr. Jorge López Villegas	MQC, especialista en Hematología, UCR. Laboratorio del Servicio de Hematología. Hospital Rafael Ángel Calderón Guardia, CCSS.
Dra. Victoria Monterroso Azofeifa (†)	Médico especialista en Patología, Servicio de Patología, Hospital México, CCSS. Exprofesora de la Facultad de Medicina y del Sistema de Estudios de Postgrado de la UCR.
Dr. Luis Mora Bermúdez	MQC, especialista en Hematología, UCR. Profesor de la Cátedra de Bioquímica Hematológica, Universidad de Ciencias Médicas (UCIMED).
Dra. Marta Navarrete Durán	Médico pediatra, Universidad Autónoma de Guadalajara; especialista en Hematología, UCR. Profesora del Sistema de Estudios Postgrado, UCR. Jefe clínica, Servicio de Hematología, Hospital Nacional de Niños, CCSS.
Dra. Catalina Obando Jiménez	MQC, UCR. Máster en Salud Pública, Universidad Santa Lucía, especialista en Citogenética. Sección de Citogenética, Laboratorio Clínico, Hospital Nacional de Niños, CCSS.
Dra. Priscila Orlich Pérez	MQC, especialista en Inmunología Clínica, UCR. Especialista en Inmunohematología, UCR. Directora, División del Banco de Sangre de Cordón Umbilical y Células Madre, Hospital San Juan de Dios, CCSS.
Dr. Juan Richmond Navarro	Médico hematólogo, UCR y Universidad Salamanca, España. Director, Servicio de Hematología del Hospital Rafael Ángel Calderón Guardia, CCSS.
Dr. Miguel Rodríguez Pineda	Médico especialista en Hematología, UCR y MQC especialista en Medicina Transfuncional, UCR. Profesor de Inmunohematología, Facultad de Microbiología UCR y médico hematólogo del Hospital Rafael Ángel Calderón Guardia, CCSS.
Dra. María Rodríguez Sevilla	Médico especialista en Hematología, UCR. Profesora del Sistema de Estudios Postgrado, UCR. Servicio de Hematología del Hospital San Juan de Dios, CCSS.
Dra. Xinia Rojas Camacho	MQC, especialista en Inmunohematología, UCR. Directora del Banco de Sangre, Hospital México, CCSS.
Dr. Luis F. Rojas Solano	Bioquímico, MSc. Catedrático jubilado de la UCR, Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina UCR. Profesor de Bioquímica de la Universidad Autónoma de Centro América (UACA).

Dr. Carlos Santamaría Quesada	MQC, PhD Ciencias Médicas, Universidad de Salamanca, España. Máster en Microbiología, Parasitología y Química Clínica, UCR. Jefe de División de Diagnóstico Molecular, Laboratorio Clínico, Hospital Nacional de Niños, CCSS.
Dra. Kathia Valverde Muñoz	Médico pediatra, especialista en Hematología, UCR. Servicio de Infectología, Hospital Nacional de Niños, CCSS.
Dr. Luis F. Vásquez Castillo	Médico hematólogo. Director del Servicio de Hematología, Hospital San Juan de Dios, CCSS.
Dra. Patricia Venegas Barboza	MQC, UCR. Especialista en Citogenética. Sección de Citogenética, Laboratorio Clínico, Hospital Nacional de Niños, CCSS.
Dr. Rolando Ulloa Gutiérrez	Médico pediatra infectólogo, UCR y Universidad de British Columbia, Vancouver. Servicio de Infectología Pediátrica, Hospital Nacional de Niños. Profesor del Departamento de Pediatría de la Escuela de Medicina de la UCR, profesor de Postgrado en Pediatría, UCR y Hospital Nacional de Niños, Universidad Iberoamericana.

PRÓLOGO DE LA SEXTA EDICIÓN

En los últimos 25 años se han logrado importantes progresos en cuanto al pronóstico y diagnóstico de diversos padecimientos hematológicos, especialmente relacionados con la citogenética, la inmunología y la biología molecular, aplicables en gran medida al estudio de la patobiología de las neoplasias.

Esos avances han sido incorporados en esta sexta edición, así como los destacados adelantos en el estudio de la hemoglobina y sus derivados, los síndromes anémicos y hemolíticos, los leucocitos, la tipología y la función de los linfocitos, el trasplante de médula ósea, la medicina transfusional, la trombosis y la hemostasia. Además, en esta nueva edición se le ha dado mayor énfasis a la citogenética aplicada.

Deseo destacar la organización estructural del contenido de esta obra, que permitirá un manejo más versátil y coherente. Al igual que en la edición anterior, el Tomo I se refiere a la teoría y el Tomo II a aspectos técnicos y metodológicos; en este último es donde se ha incluido el laboratorio de coagulación sanguínea, que facilitará la determinación de los factores de trombofilia con pruebas de última generación y que suministrará una mayor comprensión de los agentes antitrombóticos, los problemas de sangrado y la administración y el control de la anticoagulación, de los fibrinolíticos y de los antiagregantes plaquetarios. No ha escapado al interés de esta nueva edición referirnos a la “hematología nacional” y sus implicaciones epidemiológicas, especialmente en las áreas relacionadas con las hemoglobinopatías y las neoplasias.

Esta sexta edición se ha publicado gracias al apoyo de la Caja Costarricense de Seguro Social, a través de la EDNASSS, lo cual nos compromete sobremanera. La incorporación de nuevos y distinguidos coeditores, así como de nuevos autores colaboradores con capítulos específicos, le han dado a esta edición -última bajo mi responsabilidad- un carácter de obra multidisciplinaria y actualizada, que esperamos sea bien recibida por los estudiantes universitarios y los colegas de ciencias médicas que nos honren con su lectura.

Mención especial a la contribución de la Dra. Berta Valverde, quien coordinó el trabajo de todos los estimados y relevantes editores del texto, con el deseo -fructífero- de lograr un trabajo intelectual altamente apreciado.

Gracias a todos,

Dr. German Sáenz Renauld
San José, Costa Rica



Louis Pasteur

“Quiero compartir con ustedes el secreto que me ha llevado a alcanzar todas mis metas: mi fuerza reside únicamente en mi tenacidad”

LOUIS PASTEUR
CREADOR DE LA MICROBIOLOGÍA
1854

PRESENTACIÓN

Reitero lo expresado en mi proemio de la quinta edición del libro Hematología Analítica, teoría, técnica, interpretación, y me permito agregar en esta sexta publicación, que lo aquí entregado al estudio de la Hematología es un esfuerzo digno de encomio; alabanza que junto al editor responsable, Dr. German Sáenz Renauld, debe recibirla el conjunto de autores participantes, mucho de ellos jóvenes promesas que pondrán siempre en alto la hematología nacional.

En la antigua religión irania se conocen seis periodos de la creación, que corresponden a seis ángeles superiores: “los amesha spentas”, que rodean al dios Ahura Mazda. En la interpretación cristiana el símbolo de seis puntas formado por dos triángulos, puede ser el mundo que se dividía en cielo y tierra.

Una sexta edición científica señala, a mi juicio: perseverancia, dedicación, interés, esfuerzo, capacidad y conocimiento.

Felicito sinceramente al editor y al conjunto de autores.

Dr. Jorge Elizondo Cerdas
Catedrático, Universidad de Costa Rica
Ex-Director del Servicio de Hematología
Hospital San Juan de Dios

DEDICATORIA

*Al Dr. Ettore De Girolami (†), mi maestro, de quien
obtuve la mejor de las enseñanzas: respeto por las
ciencias y amor por la Hematología.*

A mis padres y a Arturo (QdDg).

A Cecilia por su comprensión y apoyo.

German F. Sáenz Renauld

AD MOIRA

*Para nuestros hijos
Y otros estudiantes del presente,
Nuestra esperanza para el futuro.*

AGRADECIMIENTO

A la Sra. Rocio Guerrero Brown y al Sr. Walter González Luna.

Los editores y autores deseamos manifestar nuestro más profundo agradecimiento por su inestimable colaboración en el desarrollo de los documentos que han permitido esta sexta edición.

Por ello, nuestra imperecedera gratitud.

ÍNDICE TOMO II

Capítulo 37.	Valores de referencia de exámenes hematológicos, manejo de muestras sanguíneas y uso de anticoagulantes <i>in vitro</i>.....	471
	<i>Dr. German F. Sáenz Renauld</i>	
	<i>Dr. Walter E. Rodríguez Romero</i>	
	<i>Dra. Melissa Granados Zamora</i>	
Capítulo 38.	El hemograma manual y automatizado.....	485
	<i>Dr. German F. Sáenz Renauld</i>	
	<i>Dra. Lidiette Salazar Palma</i>	
	<i>Dra. Melissa Granados Zamora</i>	
Capítulo 39.	Hemoglobinometría e índice hematocrito.....	499
	<i>Dr. German F. Sáenz Renauld</i>	
	<i>Dr. Walter E. Rodríguez Romero</i>	
Capítulo 40.	La velocidad de sedimentación eritrocítica: metodología y semiología.....	511
	<i>Dr. German F. Sáenz Renauld</i>	
	<i>Dr. Walter E. Rodríguez Romero</i>	
	<i>Dr. Walter Cartín Sánchez</i>	
Capítulo 41.	Citomorfología, nomenclatura y análisis del frotis sanguíneo y de médula ósea.....	517
	<i>Dr. German F. Sáenz Renauld</i>	
	<i>Dr. Walter Cartín Sánchez</i>	
	<i>Dra. Sandra Boza Oreamuno</i>	
	<i>Dr. Luis Mora Bermúdez</i>	
Capítulo 42.	Métodos de estudio del metabolismo del hierro.....	531
	<i>Dr. Luis Mora Bermúdez</i>	
	<i>Dra. Sandra Boza Oreamuno</i>	
Capítulo 43.	Métodos para la detección de eritroenzimopatías.....	541
	<i>Dra. Sandra Boza Oreamuno</i>	
	<i>Dr. Walter E. Rodríguez Romero</i>	
	<i>Dr. German F. Sáenz Renauld</i>	
Capítulo 44.	Determinación de haptoglobinas, hemoglobina plasmática, metahemoglobina y otras pruebas de perfil hemolítico.....	559
	<i>Dr. Walter E. Rodríguez Romero</i>	
	<i>Dr. German F. Sáenz Renauld</i>	
Capítulo 45.	Estudios analíticos para la determinación de hemoglobinuria paroxística nocturna.....	573
	<i>Dr. Walter E. Rodríguez Romero</i>	
	<i>Dr. German F. Sáenz Renauld</i>	
Capítulo 46.	Pruebas para detección de membranopatías y otros defectos intercorpusculares: fragilidad osmótica y autohemólisis.....	577
	<i>Dr. German F. Sáenz Renauld</i>	
	<i>Dr. Walter E. Rodríguez Romero</i>	
Capítulo 47.	Estudios de las hemoglobinopatías mediante electroforesis y cromatografía líquida de alta resolución.....	585
	<i>Dr. Walter E. Rodríguez Romero</i>	
	<i>Dr. German F. Sáenz Renauld</i>	

Capítulo 48.	Pruebas de escrutinio para la detección de hemoglobinas.....	599
	<i>Dr. German F. Sáenz Renauld</i> <i>Dr. Walter E. Rodríguez Romero</i>	
Capítulo 49.	Preparación de hemolizados para el estudio de hemoglobinas anormales, talasemia y hemoglobinas inestables.....	603
	<i>Dr. German F. Sáenz Renauld</i> <i>Dr. Walter E. Rodríguez Romero</i>	
Capítulo 50.	Análisis bioquímico de las talasemias: cuantificación de hemoglobina A₂ y de hemoglobina fetal.....	611
	<i>Dr. German F. Sáenz Renauld</i> <i>Dr. Walter E. Rodríguez Romero</i>	
Capítulo 51.	Técnicas citoquímicas para diferenciar leucemia aguda.....	621
	<i>Dra. Melissa Granados Zamora</i>	
Capítulo 52.	Estudio de la hemostasia primaria y agregación plaquetaria.....	633
	<i>Dr. Rafael Jiménez Bonilla</i> <i>Dr. Walter Cartín Sánchez</i>	
Capítulo 53.	Diagnóstico de problemas de sangrado y cuantificación de factores.....	641
	<i>Dr. Rafael Jiménez Bonilla</i>	
Capítulo 54.	Detección de trombofilia hereditaria y control de la anticoagulación.....	647
	<i>Dr. Rafael Jiménez Bonilla</i> <i>Dra. Lidiette Salazar Palma</i> <i>Dr. Walter Cartín Sánchez</i>	
Capítulo 55.	Pruebas de laboratorio para el diagnóstico de porfirias.....	651
	<i>Dr. Luis A. Mora Bermúdez</i> <i>Dr. Luis F. Rojas Solano</i>	
Anexo	Índice analítico.....	655

VALORES DE REFERENCIA DE EXÁMENES HEMATOLÓGICOS, MANEJO DE MUESTRAS SANGUÍNEAS Y USO DE ANTICOAGULANTES *IN VITRO*

*Dr. German F. Sáenz Renauld
Dr. Walter E. Rodríguez Romero
Dra. Melissa Granados Zamora*

INTRODUCCIÓN

La obtención de muestras de sangre es un procedimiento indispensable para la realización de los análisis hematológicos y es, además, un procedimiento rutinario completamente inocuo. Sin embargo, algunas veces se presentan dificultades por encontrarse las venas pequeñas o muy profundas, haber aumento de tejido adiposo, edema generalizado o quemaduras extensas.

En general, las muestras de sangre periférica se pueden obtener por dos medios: venosos o arteriales. El método a seleccionar dependerá del tipo de sangre que se requiera extraer.

La técnica de la extracción sanguínea representa un verdadero arte; no basta con ser explicada, y su perfección solo será producto de la experiencia.

PUNCIÓN DE SANGRE CAPILAR

La muestra se puede obtener del lóbulo de la oreja, de la yema del dedo y en recién nacidos del dedo gordo del pie o del talón; lo más importante en este procedimiento es que la sangre fluya de forma espontánea sin apretar mucho la zona.

Cuando se punza el talón en los neonatos, la incisión debe realizarse lateralmente y no en el centro de este, debido al problema potencial de dañar el periostio en esa zona y causar osteomielitis. Por esta misma razón, las lancetas que se usan nunca deben exceder de 2,4 mm de profundidad, y se debe tener cuidado con el ancho de estas.

Otro punto recomendable en las tomas capilares, es calentar el área de punción durante los tres minutos previos a la extracción.

La piel debe desinfectarse y luego secar con un algodón seco. Siempre debe hacerse la punción con la piel seca; en caso contrario, la sangre se extiende en una capa delgada sin formar una gota grande, lo que dificulta la toma de muestras. Debe recordarse que el alcohol precipita las proteínas y por eso siempre debe

eliminarse por completo.

Después de esterilizar y secar la zona, esta se comprime y se hace una punción firme, de manera que la gota brote con solo una pequeña presión. La primera gota debe utilizarse únicamente para preparar el frotis. Luego debe exprimirse de forma ligera para que broten nuevas gotas. Al terminar el procedimiento, debe colocarse un trozo de algodón estéril sobre la herida para detener la hemorragia; en niños pequeños no deben aplicarse curitas para evitar irritaciones y tampoco deben dejarse algodones en el dedo, porque se los pueden tragar y ahogarse.

Cuando se utiliza la yema del dedo, debe preferirse la cara lateral del dedo medio y debe punzarse la punta de este en sentido perpendicular a las líneas de la piel.

La punción capilar es utilizada tanto en niños como en adultos para procedimientos de química clínica y hematología, señalándose pequeñas diferencias con los valores de sangre venosa.

PUNCIÓN DE VASOS MAYORES

La sangre obtenida de grandes vasos puede ser de tipo venoso o arterial, según el caso; ambas se diferencian en el contenido de oxígeno y presentan valores hematológicos muy semejantes. Debido a que las venas están colocadas más superficialmente que las arterias, la mayoría de la sangre obtenida por punción de vasos mayores es de tipo venosa, apta para los estudios hematológicos y químico-clínicos.

Las venas más utilizadas son las de la fosa antecubital (medianas cubital y cefálica), y lo primero que debe hacerse es localizarlas bien; para esto deben inspeccionarse ambos brazos, para reducir la frecuencia de punzadas no exitosas.

El torniquete sirve para ayudar a la localización de la vena, por el aumento de volumen que ella experimenta; este siempre debe estar limpio para evitar infecciones y desinfectarlo después de trabajar con personas enfermas. No deben usarse muy apretados, pues cerrarían las arterias además de las venas, y siempre

deben colocarse de forma que se palpe el pulso de la arteria radial. Nunca debe mantenerse por más de un minuto, y si se retira y se quiere volver a colocar, debe dejarse un intervalo de por lo menos tres minutos para que la sangre vuelva a fluir adecuadamente antes de ponerlo de nuevo. Debe asegurarse que el torniquete no arrugue ni pellizque la piel del paciente.

Al colocar el torniquete, el paciente mantendrá el brazo recto y deberá apretar la mano firmemente hasta que la extracción haya terminado. En el caso de las arterias no es necesario el uso de torniquetes, ya que estas tienen suficiente presión sanguínea.

En general, se piensa que el mejor método es fijar la piel con una mano y nunca punzar la vena en un ángulo recto, pues se podría atravesar el vaso muy fácilmente. Es buena práctica punzar la vena de forma oblicua, es decir, con la aguja dirigida hacia un lado de la vena, en lugar de atacarla por encima, en especial cuando el vaso es muy prominente, esclerótico y móvil. Antes de la punción debe comprobarse el ajuste de la jeringa y de la aguja moviendo el émbolo hacia adelante y hacia atrás. El bisel de la aguja debe mirar siempre hacia arriba.

Cuando se intenta pinchar directamente sobre la vena, la aguja puede deslizarse sobre ella y penetrar en los tejidos perivasculares. Aun si la vena no es prominente, pero se percibe llena, elástica y bien afirmada en los tejidos subcutáneos, puede hacerse entrar la aguja de manera directa sobre la vena, pues esta no se deslizará. Es conveniente no solo punccionar la vena, sino cateterizarla un poco en la línea imaginaria que sigue el curso de esta.

Luego de haber insertado la aguja en la luz de la vena, debe retirarse el émbolo de la jeringa suavemente hasta obtener la cantidad requerida; luego se debe quitar el torniquete, pedirle al paciente que abra la mano, colocar un algodón seco sobre la aguja y retirar la jeringa junto con la aguja rápidamente. Es recomendable que el paciente no flexione su antebrazo, ya que esto producirá estasis y se favorecería la posibilidad de hematomas.

Después de obtener la sangre, es necesario mantener fuertemente apretado el lugar de la punción con un algodón seco, por al menos cinco minutos.

La escogencia de un vaso para extracción sanguínea depende del tamaño del paciente y de la facilidad para localizar el vaso. En los lactantes menores y en recién nacidos pueden utilizarse las femorales, la yugular externa, las venas del cuero cabelludo y en algunos casos las venas del brazo. En los niños mayores y en

los adultos deben investigarse primero las venas del brazo y de la mano y, posteriormente, la femoral y la yugular externa.

Para la punción femoral se debe colocar al paciente en posición supina, palpar el pulso en el dedo índice en su trayecto a través del triángulo femoral y luego introducir la aguja en forma perpendicular; este es el único caso en que la aguja no sigue la dirección del vaso, sino que se comienza a sacar la aguja y la jeringa de manera lenta hasta que la sangre entre en esta.

Para la punción de la yugular se debe colocar al paciente en posición supina en una camilla, donde la cabeza le quede colgando fuera de ella; se hace rotar la cabeza lateralmente manteniendo el cuello extendido y se introduce la aguja a la altura del borde externo del músculo esternocleidomastoideo, en un punto equidistante con respecto a la apófisis mastoides y la clavícula, hasta que la sangre fluya dentro de la jeringa.

Todos los sitios indicados para la extracción de sangre se utilizan asimismo para la transfusión de sangre arterial, toma de gases, entre otros.

Es importante mencionar que para la extracción sanguínea se pueden utilizar jeringas, tubos al vacío con agujas de doble punta o catéteres. Hasta el momento se ha explicado la metodología con jeringas; a continuación se mencionan algunos aspectos sobre los otros procedimientos:

- La mayoría de los tubos al vacío vienen siliconados, incluso el tapón, y pueden contener o no diversos anticoagulantes según el uso y deben ser estériles. Hay que recordar que en estos tubos la sangre sale inmediatamente al momento en que se atraviesa el tapón con la aguja doble, lo que en ocasiones puede producir ligera hemólisis.
- Entre las ventajas del vacío se indica el que se obtienen muestras con óptima relación de sangre/ anticoagulante.
- Cuando las muestras se toman de catéteres que se hallan insertados en piernas, brazos o cordón umbilical en neonatos, se debe evitar la contaminación con el anticoagulante que se usa para mantener el flujo del catéter.
- La aspiración de sangre por el catéter debe ser suave para no hemolizar la muestra.
- No se recomienda la utilización de catéteres para estudios de coagulación.

PRECAUCIONES PARA LA TOMA DE MUESTRAS SANGUÍNEAS

1. La persona que toma la muestra sanguínea debe infundir respeto y confianza durante la extracción, utilizar equipos de excelente calidad y no practicar extracciones sanguíneas abundantes en corto plazo.
2. Si se utiliza un torniquete, este nunca debe mantenerse puesto por más de un minuto en el caso que cueste palpar la vena u obtener la muestra.
3. Lo más importante de las punciones venosas es la palpación del pulso de la vena y no el que esta se vea, ya que algunas venas superficiales se desplazan mucho ante la aguja por falta de tejido de sostén.
4. La estasis prologada altera fundamentalmente los electrolitos y los gases sanguíneos.
5. En casos de venas difíciles, debe punzarse cuando se tenga la seguridad de que hay un vaso sanguíneo apto, y no punzar de manera repetida al paciente.
6. Nunca debe obtenerse sangre de un miembro con vía parenteral, un miembro congestionado sobre el cual haya estado recostado el paciente por largo rato, ni de zonas con quemaduras, edematosas, inflamadas o infectadas; así como tampoco de manos muy frías, cianóticas o sudorosas en caso de punciones capilares.

COMPLICACIONES DE LA EXTRACCIÓN SANGUÍNEA

En algunas personas se produce un ligero síncope, causado por razones emotivas; en estos casos se debe mantener al paciente acostado con los pies más altos que la cabeza para que la recuperación sea rápida.

En los pacientes hemofílicos, en aquellos con tendencia a hemorragias y en las punciones arteriales, debe mantenerse una presión adecuada sobre el sitio de la punción por un tiempo mayor a cinco minutos, para evitar extravasación de sangre.

Cuando se pincha mucho un mismo vaso pueden producirse fenómenos trombóticos, por lo cual debe evitarse en lo posible las punciones repetidas de una misma vena.

Algunas veces, sobre todo en niños pequeños y en punciones femorales, la sangre puede salir sumamente roja, debido a que se obtuvo sangre arterial en lugar de venosa.

Sin embargo, la complicación más frecuente al extraer sangre es la formación de hematomas por atravesar la vena con la aguja, con la consecuente extravasación de sangre a los tejidos. En estos casos es conveniente presionar el hematoma en el momento en que se comienza a formar, mantener el brazo en posición extendida y, si es muy grande, aplicar un trozo de hielo cubierto con un paño. Esta complicación no conlleva ninguna secuela seria.

La sangre obtenida de punción capilar o venosa puede sufrir hemólisis por múltiples causas, entre las que se cuentan: residuos de alcohol en jeringas o agujas; restos de agua en jeringas o tubos de ensayo; expulsión demasiado violenta al transferir la sangre al tubo de ensayo (siempre debe quitarse la aguja de la jeringa y evitarse el hacer espuma); mantener a temperaturas elevadas la sangre antes de los análisis; uso de soluciones no isotónicas; congelación y descongelación de las muestras; tratamiento brusco de las muestras y conservación demasiado prolongada, sobre todo si no se ha extraído el coágulo.

DIFERENCIA ENTRE SANGRE CAPILAR Y SANGRE VENOSA

El aspecto diferencial más importante entre la sangre capilar y la venosa, es la fácil obtención de las muestras capilares en relación con las venosas. Para efectos prácticos, la información suministrada de los parámetros hematológicos es muy semejante.

No obstante, la obtención de sangre capilar tiene el problema de que en su toma pueden influir errores que alteren los valores obtenidos. Para evitar esto, se debe obtener siempre la muestra cuando el flujo de sangre es espontáneo y nunca debe apretarse la zona de manera fuerte.

La diferencia entre los valores hematológicos de sangre venosa y capilar varía según algunos investigadores; se ha encontrado que las cifras de hemoglobina y hematocrito son por lo menos un 5% más elevado en sangre capilar que en sangre venosa; esta diferencia se hace más marcada si el paciente es policitémico.

Por el contrario, el cómputo plaquetario es más alto en la sangre venosa que en la capilar, debido a la adhesión de esos elementos a los sitios de punción capilar. En cuanto al cómputo de leucocitos, este es muy semejante en ambas muestras, siempre y cuando la sangre fluya espontáneamente de la punción capilar; si no fuera así, el cómputo sería más elevado en la sangre capilar.

MANIPULACIÓN DE LAS MUESTRAS DE SANGRE**Recomendaciones**

- a. Mantener una identificación y una relación adecuada entre sangre y anticoagulante (si se requiere).
- b. Nunca deben hacerse exámenes hematológicos en muestras que tengan más de seis horas de extraídas, sobre todo si la temperatura ha sido muy elevada. Los conteos celulares en aparatos automatizados pueden retardarse hasta 12 horas, si las muestras se refrigeran de forma adecuada.
- c. Seguir las normas generales de manejo de muestras potencialmente infecto-contagiosas.

SEPARACIÓN DE LAS CÉLULAS SANGUÍNEAS

Muchas veces es necesario separar algunos de los componentes de la sangre antes de realizar el análisis, para la cual se usan diferentes anticoagulantes y velocidades de contrafiguración.

La sangre se puede separar en varios componentes, por ejemplo, glóbulos rojos empacados y plasma. A su vez, el plasma se puede separar en plasma rico en plaquetas (PRP) y plasma libre de plaquetas. Este último se puede congelar y obtener crioprecipitados (factores de la coagulación) y plasma humano normal.

La preparación del plasma rico en plaquetas (PRP) normalmente involucra el uso de citrato de sodio, citrato ácido, heparina o EDTA.

CONSERVACIÓN DE PLAQUETAS

Se recomienda más conservar las plaquetas a temperatura de 22 °C que a 4 °C. Usualmente se conservan concentradas en su plasma residual.

CONSERVACIÓN DE SANGRE TOTAL

La sangre por lo general se conserva a temperaturas entre 2-6 °C. La tasa de glicólisis es alrededor de 40 veces más baja a esta temperatura que a otras temperaturas superiores a esta (aproximadamente 0,05 nmol/L de los glóbulos rojos por hora a 4 °C, comparado con los 2 nmol/L por hora a 37 °C).

La sangre se conserva mejor en frío. Los congeladores de las neveras acostumbran estar a 5-10 °C bajo cero. Para conservar ciertas fracciones séricas se necesitan temperaturas por debajo de 20 °C bajo cero o más. Entonces, es preciso que se cuente con un buen congelador, para que las condiciones de preservación sean óptimas.

CAMBIOS NOCIVOS EN EL ERITROCITO

A pesar de la reducción significativa que sufre la glicólisis en sangre almacenada a 4 °C, siempre se produce ácido láctico a causa del descenso en el pH, el cual interfiere en la función de las enzimas tales como hexoquinasa y fosfofructoquinasa.

La sangre preservada en refrigeración pierde su viabilidad, ya que comienzan a depletarse los fosfatos orgánicos, la adenosina trifosfato (ATP) y el 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG). Sin embargo, la sangre total se puede preservar algunos días en refrigeración a las temperaturas de 2-6 °C, teniendo claro que se dan una serie de cambios progresivos, como desaparición de las plaquetas, consumo de glucosa y degeneración de los leucocitos; además de que los glóbulos rojos se vuelven lábiles, así como algunos antígenos eritrocíticos.

Específicamente, el descenso del ATP se asocia con las siguientes alteraciones eritrocitarias:

1. Cambios de la forma discocítica a esfera.
2. Pérdida de la membrana lipídica (cerca de un 25% después de ocho días de almacenamiento con ácido-citrato-dextrosa, ACD).
3. Un descenso crítico en el volumen del eritrocito.
4. Un incremento notable en la rigidez celular.

Depleción del 2-3 difosfoglicerato (2,3-Dpg)

En la sangre, el 2,3-DPG y la hemoglobina se encuentran en una razón equimolecular. Los cambios que ocurren en la curva de disociación del oxígeno de los eritrocitos se deben a la depleción del 2,3-DPG. Se sabe que los eritrocitos almacenados pueden ser restaurados a la forma normal por incubación de los eritrocitos con inosina.

El 2,3-DPG baja la afinidad de la hemoglobina (Hb) por el oxígeno a las concentraciones comúnmente encontradas en los eritrocitos. Un mol de 2,3-DPG se combina con un mol de deoxi-Hb para formar un complejo que es altamente resistente a la oxigenación; el DPG puede ser desplazado por el oxígeno unido a la Hb. El ATP tiene un efecto similar al del DPG, pero la concentración del ATP es de cuatro a cinco veces más baja.

Se ha observado que la curva de disociación del oxígeno en sangre citratada almacenada se desplaza hacia la izquierda; esto sugiere que tal sangre, luego de una transfusión, puede ser (al menos de manera temporal) incapaz de liberar un gran volumen de oxígeno en los tejidos de la sangre normal. Se ha demostrado que

estos cambios se expresan al máximo después de una semana de almacenamiento con ACD.

La conclusión lógica sobre estos cambios en la curva de disociación del oxígeno de los eritrocitos almacenados, es que son producto de la depleción del DPG.

Otros cambios producidos

Ocurren otros cambios en sangre conservada a 4 °C. El transporte activo del Na⁺ y K⁺ a través de la membrana del eritrocito se encuentra casi detenido, y las concentraciones, tanto intra como extracelulares, tienden a estar en equilibrio.

No es satisfactorio conservar la sangre con heparina, porque tiende a coagularse si se almacena por más de 12-24 horas. Si se desea evitar esto, se debe utilizar el doble de heparina de litio de lo usual (por ejemplo, 1000 UI, en lugar de 500 UI para 500 ml de sangre).

Se ha determinado que las sales dipotásicas y tripotásicas del EDTA preservan muy bien la sangre y la citomorfología.

SEPARACIÓN DE LOS LEUCOCITOS

La obtención de una verdadera capa de leucocitos es algo difícil. Pueden adoptarse varios métodos, aunque en general, no hacen falta altas concentraciones de leucocitos en un laboratorio rutinario.

Un método simple para obtener una suspensión de leucocitos consiste en extraer alrededor de 20 ml de sangre con anticoagulante y centrifugar por 15 minutos a 2.000 r.p.m. Entre la capa de eritrocitos y la de plasma quedará una capa blanquecina, formada especialmente por leucocitos y plaquetas. Se debe extraer con un tubo de aspiración el plasma y recoger con una pipeta la capa blanquecina (aunque se mezcle con parte de los eritrocitos), y en total se logrará extraer 1 ml de líquido. Este se debe diluir con 9 ml de una solución de saponina al 1% en salina fisiológica y mezclar sin hacer espuma. Los 10 ml de líquido se ponen en la centrífuga a escasa velocidad durante 30 minutos; se aspira el líquido rojo sobrenadante y en el fondo quedará una capa de leucocitos con plaquetas. La separación de estos dos elementos es difícil, a no ser que se disponga de procedimientos especiales: una centrífuga de gran capacidad y unos tubos especiales con una estrangulación central.

Los leucocitos tienden a aglutinarse de manera fácil, en especial por estas manipulaciones de centrifugación, por lo que es difícil obtener una suspensión de

leucocitos en donde estas células estén del todo libres y por ello, comúnmente se presentan conglomerados.

Otro procedimiento para concentrar leucocitos se realiza centrifugando sangre adecuadamente anticoagulante en tubos de Wintrobe, donde se descarta el plasma que queda en la capa superior y se obtiene una capa blanca en la que se encuentran los leucocitos concentrados.

CONSERVACIÓN DE LOS LEUCOCITOS

Bajo condiciones óptimas de conservación la mayoría de los leucocitos de la sangre total se destruyen dentro de las primeras 36 horas. Algunos investigadores han demostrado que cerca de un 11% de los leucocitos se destruyen al primer día y que luego del sexto día esa cifra llega a un 25%; así, aunque pueden todavía contarse, no es posible distinguir su morfología, pues tienden a sufrir degeneraciones importantes, que hacen que vayan perdiendo su viabilidad conforme pasa el tiempo de conservación. Los leucocitos viables tienen poca actividad bactericida al final del cuarto día de su conservación. Es claro, entonces, el pobre beneficio que se puede brindar en casos de pacientes con leucopenia o agranulocitosis, cuando la sangre al transfundirse ha sido almacenada por más de un día a 4 °C.

ALGUNOS VALORES DE REFERENCIA EN HEMATOLOGÍA

Establecer los límites hematológicos normales es bastante problemático. Las variaciones son considerables aun en un mismo individuo, y la edad y el sexo determinan importantes diferencias. Las variaciones en las técnicas pueden explicar algunas diferencias encontradas en la literatura. La línea divisoria entre salud y enfermedad es a veces indefinida, de tal suerte que un cómputo de 10.000 leucocitos/ μ l puede ser anormal para un individuo que usualmente tiene sus leucocitos entre 4.000 y 6.000/ μ l, para otra persona 10.000 células por μ l es un límite máximo, pero dentro de sus valores normales.

Sin embargo, se pueden establecer algunos parámetros generales, como los que se detallan a continuación.

Hemoglobina (g/dl)

De acuerdo con el Sistema Internacional de Unidades (SI), se puede reportar la Hb en mmol/L, al multiplicarse los g/dl por 0,155.

Los rangos de referencia para la hemoglobina son:

Sangre de cordón	16,38 ± 1,12 g/dl
Sangre venosa	19,81 ± 1,80
Sangre capilar	22,38 ± 2,30
Niños (1 año)	11,2 ± 1,2
Niños (10 años)	12,9 ± 1,2
Mujeres	12,50 a 14,80
Hombres	14,30 a 17,0

Hematocrito (ml/dl; %)

De acuerdo con las unidades SI, se le puede reportar en L/L, o simplemente en porcentaje.

Recién nacidos:	
Sangre de cordón	48±5 ml/dl
Sangre venosa	57±6 ml/dl
Sangre capilar	65±7 ml/dl
Niños (1 año)	35±1 ml/dl
Niños (10 años)	37±1 ml/dl
Mujeres	37,00-47,00 ml/dl
Hombres	42,30-53,70 ml/dl

A continuación, en el Cuadro N° 1, se muestran las principales variaciones existentes entre la hemoglobina y el hematocrito, según la edad.

Cuadro N° 1. Variaciones en la Hb y el Hto según edad		
Edad	Hto (ml/dl)	Hb (g/dl)
1 ^{er} día	54	19,5
2-3 días	53	19,0

Cuadro N° 1. Variaciones en la Hb y el Hto según edad		
Edad	Hto (ml/dl)	Hb (g/dl)
4-8 días	52	18,5
9-13 días	49	16,5
14-60 días	47	15,5
3-5 meses	38	14,2
6-11 meses	36	12,0
1 año	35	11,8
2 años	35	11,2
3 años	36	11,2
4 años	37	11,5
5 años	37	12,5
6-10 años	37	12,6
11-15 años	39	13,5

Los límites inferiores de hemoglobina para definir anemia a nivel del mar, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud -OMS- (Serie de informes técnicos No. 405, Ginebra, 1968) son los siguientes:

Niños de 6 meses a 6 años	11 g/dl
Niños de 6 años a 14 años	12 g/dl
Hombres	13 g/dl
Mujeres no embarazadas	12 g/dl
Mujeres embarazadas	11 g/dl

En el Cuadro N° 2 se detallan los valores de los parámetros de serie roja a distintas altitudes, en adultos normales.

Cuadro N° 2. Valores de los parámetros de serie roja a diferentes altitudes en adultos normales											
Parámetros		Altitudes									
		Nivel del mar		1000 (m)		1860 (m)		2220 (m)		2570 (m)	
		M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
Hemoglobina (g/dl)	Media Límites (± 2 DE)	16	14,1	15,8	13,8	16,8	14,5	17,4	14,6	17,6	15,3
		13,6	12,9	14,0	11,9	14,6	12,7	15,6	12,6	15,2	13,1
		18,4	18,3	17,6	15,7	19,0	16,3	19,2	16,6	20,0	17,5

Cuadro N° 2. Valores de los parámetros de serie roja a diferentes altitudes en adultos normales											
		Altitudes									
Parámetros		Nivel del mar		1000 (m)		1860 (m)		2220 (m)		2570 (m)	
		M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
Hematocrito (L/L)	Media	0,49	0,44	0,48	0,42	0,51	0,45	0,51	0,45	0,53	0,47
	Límites (± 2 DE)	0,43	0,38	0,43	0,37	0,45	0,39	0,46	0,40	0,46	0,41
		0,56	0,50	0,53	0,47	0,57	0,51	0,56	0,50	0,59	0,53
Eritrocitos (millones/ul)	Media	5,15	4,65	5,28	4,69	5,76	4,92	5,69	4,99	5,63	4,95
	Límites (± 2 DE)	4,39	3,88	4,63	4,16	4,87	4,21	5,10	4,28	4,95	4,31
		5,91	5,42	5,93	5,12	6,51	5,63	6,30	5,71	6,31	5,59

Eritrocitos (millones por μ l de sangre, $1 \times 10^{12}/L$)

Las causas fisiológicas de variación de los eritrocitos son:

- 1) Actividad muscular.
- 2) Factores psíquicos (excitación o miedo).
- 3) Altitudes elevadas.
- 4) Género (después de la pubertad, el valor es mayor en los hombres que en las mujeres).

La edad posee una influencia importante.

Solo debe dársele valor a los cálculos de eritrocitos efectuados con un contador electrónico.

Hombres	4,5 – 6,5 x 10^6 / μ l ($=10^{12}/L$)
Mujeres	4,0 – 5,3
Recién nacidos	
Sangre de cordón	4,3 $\pm$ 0,5
Sangre venosa	5,1 $\pm$ 0,8
Sangre capilar	5,8 $\pm$ 0,8 (Costa Rica)
Niños (1 año)	4,5
Niños (10 años)	4,7

Reticulocitos (cálculo relativo)

Recién nacidos	2,5 - 6,5%
Adultos	0,5 - 1,5%
Índice reticulocitario	1,0

Reticulocitos (valores absolutos): 50.000 – 100.000/ μ l (50 - 100x $10^9/L$)

Hemoglobina corpuscular media (HCM) (pg)

En recién nacidos es alrededor de 40, para reducirse rápidamente a la cifra de la infancia, 27 a 32 pg.

Concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) (g de Hb/100 ml)

En recién nacidos es alrededor de 45, para reducirse rápidamente a la cifra de la infancia, 31 a 34; adultos: 31-35%

Volumen corpuscular medio (VCM) (fl)

Normales = 82-94 fl; en el recién nacido es de 95-105 fl.

Velocidad de eritrosedimentación (VES) (mm/h)

Wintrobe (1 hora)	Westergren (1 hora)
Varones: 0 a 7 mm	< 15 mm
Mujeres: 0 a 15 mm	< 20 mm
Niños: 0 a 20 mm	< 15 mm

Luego de los 50 años aumentan 5-10 mm (Westergren).

Leucocitos (μ l)

De acuerdo con las unidades SI, los leucocitos pueden reportarse $10^9/L$, con lo que un conteo de 5000 / μ l equivale a $5 \times 10^9 /L$.

Recién Nacidos: 10.000/ μ L o mayor (rara vez excede 20.000/ μ l).

Niños	5.000 a 14.000/ μ l
Adultos	5.000 a 10.000/ μ l

El número normal de leucocitos en la sangre de adultos es de 5.000 a 10.000/ μ l. Estas cantidades son de amplia variación y las cifras halladas en un mismo individuo, con pocas horas de diferencia, pueden variar en estados normales hasta 2.000/ μ l.

Por la mañana hay menos cantidad de leucocitos que por la noche. Existen ciertas leucocitosis fisiológicas creadas por el ejercicio muscular, la digestión, la influencia del calor o del frío y las emociones intensas. Estas leucocitosis se consideran provocadas por una redistribución de los leucocitos del compartimiento marginal al circulante.

Al nacer el número de leucocitos es elevado y puede alcanzar cifras de hasta 25.000/ μ l. En la primera semana, entre el tercero y el cuarto día, se produce un descenso de estos, hasta cifras de 9.000 y 10.000/ μ l; estas cifras se mantienen y luego disminuyen paulatinamente hasta llegar en la pubertad a igualar los valores del adulto.

De igual forma, el número de los leucocitos en la primera infancia es bastante variable en cada persona; así, pueden hallarse cómputos de hasta 12.000 leucocitos por μ l (1° al 7° año) que se consideran normales.

Hemograma de Schilling (adultos)

Neutrófilos segmentados	40-70%
Células en banda	0- 4%
Metamielocitos	0%
Mielocitos	0%
Eosinófilos	1-5%
TOTAL GRANULOCITOS	50-70%
Linfocitos	20-45%
Monocitos	2-10%

Plaquetas (ul)

La cifra varía con los diferentes métodos; en términos generales, de 160.000 a 450.000/ μ l (0,20 - 0,40 x 10^{12} /L).

Otros valores de referencia

Tiempo de coagulación:

- Método venoso de Lee y White = 5 a 10 minutos (a 37 °C).
- Método de Sabrazé (sangre capilar) = 2 a 8 minutos.

Tiempo de sangrado:

- Método de Duke = menos de 5 minutos.
- Método de Ivy = menos de 8 minutos.

Urobilinógeno fecal: 20-280 mg/24 horas.

Bilirrubinemia:

- B. directa = 0,05-0,30 mg/dl.
- B. indirecta = 0,30-0,55 mg/dl.
- B. total = 0,35-0,85 mg/dl.

Patrón Electroforético de la Hb = normal Hb AA

- Hemoglobina F = menos del 2% de la Hb total (Singer).
- Hemoglobina A₂ = menos de 3,8% de la Hb total.
- Metahemoglobina sanguínea = menos del 2% (Evelyn y Malloy).
- Haptoglobinas séricas = 50-170 mg/dl (electroforético; filtración gel; peroxidásico).

Tiempo de protrombina:

- Referido como actividad (plasma) = 80-100%

Tiempo de tromboplastina parcial (activado):

- Según el método; usualmente menos de 40 segundos.

Fibrinógeno:

- Según el método; usualmente de 200-450 mg/dl.

Retracción del coágulo:

- Método de Mac Farlane = menos del 20%.

Hierro sérico:

- Mujeres de 50-160 ug/dl
- Hombres de 60-180 ug/dl

Protoporfirina eritrocítica ligada al Zinc (PPE-Zn):

- Depende del hematofluorómetro; por lo general, menos de 2 ug/g de Hb.

Capacidad total de filtración de hierro por el suero: 250-400 ug/dl.

Índice de saturación de la transferrina: 25-45%.

Vitamina B₁₂: 170-900 pg/ml (quimioluminiscencia).

Acido fólico: 3-17 ng/ml (quimioluminiscencia).

ALGUNOS PLAZOS MÁXIMOS PARA LA REALIZACIÓN DE ANÁLISIS HEMATOLÓGICOS

Si se recoge sangre estéril con EDTA potásico (1,5 mg/ml de sangre), se podrán practicar exámenes dentro del plazo que se señala a continuación (sangre a 4 °C) (Cuadro N° 3):

Cuadro N° 3. Plazos máximos para la realización de análisis hematológicos	
Análisis hematológico	Plazo
Hemoglobina	96 horas
Cómputos celulares	12 horas
Cómputo de eosinófilos (directo)	8 horas
Hematocrito	12 horas
Bilirrubinas	4 horas
Frotis para el cómputo diferencial (fórmula leucocitaria)	4 horas (+)
Tinción de peroxidasa, sudán, PAS, etc.	3 horas
Prueba de fragilidad osmótica (puede usarse heparina)	8 horas
Velocidad de sedimentación	6 horas (++)
Cómputo de reticulocitos	24 horas
Cómputo de plaquetas	8 horas
Estudios hemoglobinopatías	Idealmente < de 3 días
Meta Hb	4 horas
Haptoglobinas, FeS (Suero)	8 días
Pruebas de coagulación (TP, TTP, TT y otras) (citrato de sodio 3,8%)	8 horas plasma refrigerado; 24 horas plasma congelado

(+) = Se aconseja hacer los frotis inmediatamente después de obtenida la muestra (venosa o capilar). El punteado basófilo desaparece en la sangre con EDTA.

(++) 18 horas para Westergren.

ANTICOAGULANTES DE USO EN EL LABORATORIO CLÍNICO

La coagulación sanguínea puede evitarse por medio de una serie de sustancias, muchas de ellas químicamente diferentes, que tienen como función eliminar o bloquear uno o más elementos o fases de la coagulación. Otros compuestos denominados también "anticoagulantes" no lo son en el sentido estricto de la palabra, ya que su función es la de alterar la síntesis de globulinas específicas necesarias para la coagulación (por ejemplo, los cumarínicos que compiten con la vitamina K en la síntesis funcional de protrombina y otros factores en el hígado).

Los anticoagulantes, como un conjunto heterogéneo, se pueden clasificar en tres grupos principales, según su naturaleza y modo de acción:

- Inhibidores naturales de la coagulación: formados por el mismo organismo y pueden circular en la sangre. Pueden ser normales o patológicos.
- Anticoagulantes de acción *in vivo* de actividad compleja: son productos medicamentosos que pueden tener acción directa sobre la sangre (heparina) o no (cumarínicos).
- Anticoagulantes de acción *in vitro*: por lo general, no poseen acción *in vivo*. Son de naturaleza muy diversa. Aquí pueden incluirse algunos procedimientos físicos.

Inhibidores naturales de la coagulación

El peligro de una coagulación masiva y extensa en el sistema vascular es evitado por la presencia de factores anticoagulantes naturales. Tan peligroso y nocivo puede ser un trastorno hemorrágico, como la propensión a coagulación intravascular, con las consabidas trombosis y embolias. Esto último es controlado por diversos factores anticoagulantes, fundamentalmente antitrombóticos. Cuando precisa disminuir la coagulabilidad de la sangre, para prevenir la formación de trombosis o embolias, o evitar que estos procesos aumenten de intensidad, se procede al tratamiento con anticoagulantes sintéticos o naturales, como es el caso de la heparina, especialmente la de bajo peso molecular.

- **Heparina**

Es producida por las células basófilas de los tejidos y se almacena dentro de los gránulos de dichas células. Comercialmente, se obtiene de la mucosa y de los pulmones del ganado vacuno o porcino. Actúa como un anticoagulante en diferentes puntos en la secuencia de la coagulación. Reacciona con la antitrombina III, como un cofactor para inhibir al factor Xa y otros factores activados (IXa, XIa y XIIa). Además, inhibe la formación o la actividad del complejo Xa-V-FP3. Por ende, estas reacciones son antitrombotéricas. También tiene un efecto directo antitrombótico e inhibe las reacciones de liberación plaquetaria.

In vitro la heparina afecta todas las pruebas de coagulación. Se acepta que el efecto más importante que tiene es facilitar el efecto de la antitrombina III. Se ha supuesto que actúa desplazando el factor Xa del complejo fosfolipídico. Este es el mejor anticoagulante, especialmente en seco, cuando se busca reducir al mínimo la hemólisis (por ejemplo, para las mediciones de electrolitos, gases sanguíneos y estudios de fragilidad osmótica). No resulta conveniente para los frotis teñidos por los métodos de Wright-Leishmann, pues produce una coloración azul difusa. En el comercio existen soluciones de 100, 1.000 y 10.000 unidades internacionales por mililitro; la heparina purificada suele tener cuando menos 100 UI/ml, pero deben consultarse las indicaciones del fabricante antes de utilizar este producto.

La heparina es el anticoagulante que menos interfiere en la mayoría de las determinaciones, incluso a concentraciones muy superiores a las necesarias para evitar la coagulación, no produce ninguna alteración en el volumen de los eritrocitos. Esta sustancia puede obtenerse en forma de sales de sodio, calcio o amonio. Se prefiere la última para las determinaciones de electrolitos.

In vivo se utiliza la prueba de TTP para el monitoreo del tratamiento. La acción anticoagulante de la heparina se neutraliza *in vivo* con la protamina básica, que neutraliza sus cargas negativas. La heparina, además de sus propiedades como sustancia con fuerte poder anticoagulante *in vivo*, es excelente para el laboratorio.

La heparina es menos tóxica que el citrato de sodio y por lo tanto, se prefiere como anticoagulante para la cirugía cardiovascular y en las exanguinotransfusiones, en las que grandes cantidades de sangre son administradas rápidamente.

Su efecto anticoagulante es de corta duración *in vivo*, pero si se usa en concentraciones elevadas *in vitro*, puede prevenir la coagulación de sangre refrigerada por tres o más días.

- **Oxicumarínicos**

Son poderosos "anticoagulantes" de acción únicamente *in vivo*. Tienen la ventaja de ser activos por vía oral, y contrario al efecto inmediato de la heparina, muestran su acción anticoagulante a las 24-36 horas de su ingestión.

La dosificación varía según el preparado. Debe tomarse en cuenta que una vez puesto en marcha su efecto anticoagulante, este no disminuye prontamente. Su antídoto más eficaz es la vitamina K, que se requiere para la carboxilación de un aminoácido, el gamma carboxiglutamato, que se encuentra en cada uno de los factores de coagulación dependientes de la vitamina K (II, VII, IX, y X) y es el que tiene que ver con la capacidad que poseen esas proteínas de ligar al calcio. Por lo tanto, las oxicumarínicos alteran la síntesis de los factores plasmáticos que dependen de la vitamina K y los convierten en factores no coagulables o inactivos (no carboxilados), incapaces de ligar el calcio.

Anticoagulantes de acción *in vitro*

Su acción no solo consiste en evitar la coagulación de la sangre, sino también en mantenerla en un estado fisicoquímico lo más similar a lo fisiológico. Sin embargo, algunos anticoagulantes alteran la composición química del plasma, otros producen migraciones de agua o de iones entre el plasma y las células, y otros interfieren con algunas reacciones químicas.

A continuación, se indican los de mayor uso y sus mecanismos de acción.

- **Heparina**

Se usa *in vitro* en una concentración de 0,1-0,2 mg/ml de sangre.

Esta sustancia es un mucopolisacárido químicamente semejante al condroitín sulfato, con gran riqueza en ácido glucurónico (26%) y glucosamina (23%). Es un anticoagulante tan eficaz que 1 mg de heparina de buena calidad es capaz de impedir la coagulación de 50 ml de sangre.

- **Sustancias que eliminan el ión calcio**

Esta clase de anticoagulantes es la más usada en hematología. En las siguientes líneas se explican ciertos detalles relativos a las técnicas para su uso y a las diferentes clases que existen. Algunos como el de Wintrobe y los oxalatos se citan básicamente por asuntos históricos.

- **Anticoagulante de Wintrobe**

Mezcla doble de oxalatos; se emplea en concentraciones de 2 mg/ml de sangre.

Wintrobe demostró que el oxalato de potasio disminuye el tamaño de los eritrocitos, mientras que el oxalato de amonio hace lo contrario. Se emplean en una relación de 6 mg de oxalato de amonio y 4 mg de oxalato de potasio para 5 ml de sangre, de forma tal que los eritrocitos no se alteran sustancialmente. Por tal hallazgo, se usó de rutina la mezcla de Wintrobe para conservar la sangre que iba a ser utilizada para efectuar hemogramas, eritrosedimentación, hematocritos y una serie de análisis químico clínicos.

- **Citrato de sodio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\cdot 2\text{H}_2\text{O}$)**

Se utiliza en una proporción de 0,5 ml de la solución al 3,8% para 4,5 ml de sangre (relación 1:9). Se ha recomendado el uso de una solución 109 mmol/l (que equivale a 32,08 g/l). El mecanismo de acción es algo diferente al de las sustancias anteriores, pues crea un complejo molecular soluble en el cual el calcio está fijo; por lo tanto, la forma iónica del plasma desaparece.

La solución al 3,8% se ha hecho clásica, especialmente por el uso que se hace de ella en la determinación de la velocidad de sedimentación globular (Westergren), y es el anticoagulante de elección para realizar pruebas de coagulación (TTP, TT, TP).

El citrato sódico está muy indicado para la conservación de la sangre a largo plazo, por lo que suele usarse para preparar la sangre que se almacena

para transfusiones. En este caso se utiliza la siguiente mezcla:

Solución ACD mejorada pH 5,0:	
Citrato trisódico dihidratado	2,55 g
Ácido cítrico monohidratado	0,80 g
Dextrosa anhidra	1,20 g
Agua destilada c.s.p.	100 ml

Para 500 ml de sangre, se emplean 63 ml de la solución anterior.

- **Solución de citrato-fosfato-dextrosa (CPD)**

Las ventajas de esta solución son: proporcionar un pH más alto a todo lo largo del período de conservación y menos citrato que la sangre con ACD, y ser isotónica con el plasma, manteniendo el tamaño de los eritrocitos durante la recolección.

Su fórmula es la siguiente:

$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	25,80 g
$\text{H}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\cdot \text{H}_2\text{O}$	3,20 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$	2,18 g
$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	25,0 g
Agua destilada c.s.p. (estéril)	1000

Se usan 70 ml para la recolección de 500 ml de sangre.

El problema de utilizar el ACD es la gran cantidad de citrato, lo que en las transfusiones masivas puede producir un estado hemorrágico, debido a la dilución de plaquetas y de factores de la coagulación. Por otra parte, la toxicidad del citrato en enfermedades hepáticas ha sido bien demostrada.

En la exsanguinotransfusión del recién nacido no se utiliza sangre con ACD, porque puede disminuir los niveles de calcio iónico a límites peligrosos. La heparina es el anticoagulante que normalmente se escoge en estos casos, al igual que para los procesos de circulación extracorpórea.

- **Sales EDTA**

El ácido etilen-diamino tetra-acético se utiliza a una concentración de 1-2 mg/ml. El secuestro es la sal disódica; el verseno la dipotásica. La sal más usada en hematología es la K_2 -EDTA.

Como anticoagulante actúa formando “sales” de calcio insolubles e inhibiendo el factor lábil (V) (Figura N° 1). Por quelación, impide que se ionice el calcio y ejerce, por lo tanto, una acción anticoagulante muy intensa. Para uso de laboratorio se emplean de 1 a 2 mg de polvo seco por mililitro de sangre.

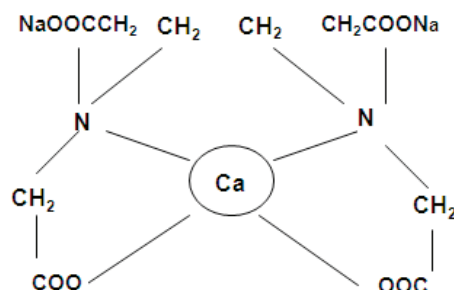


Figura N° 1. Formación estructural del complejo EDTA-cálcico disódico.

Las sales potásicas del EDTA son los anticoagulantes de elección para el trabajo hematológico de rutina, así como para algunos análisis en química clínica. Conservan mejor la sangre que los oxalatos y además, los elementos celulares se alteran menos. No debe usarse para pruebas de coagulación, pues como ya se mencionó, inhibe el factor V y por ende, alarga el TP y el TTP.

Estos anticoagulantes tienden a impedir que las plaquetas se aglutinen o adhieran a las superficies, por lo que es posible obtener cálculos bastante exactos de estos elementos en sangre anticoagulada con EDTA, varias horas después de obtenida la muestra.

Si hay que preparar el anticoagulante (muestras de sangre de 5-8 ml), se ponen 0,1 ml de solución acuosa al 10% de EDTA en tubos o frascos de tapón de rosca y se evapora a sequedad, a temperatura no mayor a 50 °C. Cada tubo funciona con un volumen de 5-8 ml de sangre. Puede usarse en forma líquida por la relativa insolubilidad del anticoagulante desecado.

Se ha demostrado que si se emplean concentraciones menores a 1,0 mg/ml de sangre (de EDTA disódico), alrededor de un 5-10% de las muestras de sangre presentan microcoágulos que falsean los resultados hematológicos. Por el contrario, si es mayor a 2,5 mg/ml, se producen alteraciones prematuras del volumen eritrocítico y de la morfología de los leucocitos. Lo ideal es lograr una concentración cercana a 1,7 mg/dl.

Por otra parte, se ha comprobado que sobre los 4 mg/ml se alteran los índices eritrocíticos con una caída de la CHCM, lo que afecta también las plaquetas, al hincharse y desintegrarse, provocando cálculos artificialmente altos.

Otras sustancias con efectos anticoagulantes

- **Hirudina:** se trata de un extracto de cabeza de sanguijuela (*Hirudo medicinalis*), que se emplea en una concentración de 0,1 ml/ml de sangre. Es un anticoagulante natural muy potente, considerado como uno de los mejores; aunque resulta caro. Su mecanismo de acción es de tipo antitrombínico. Al parecer, tiene menor incidencia de fenómenos hemorrágicos que la heparina.
- **Polietanol-sulfato sódico:** la concentración empleada es de 2-5 mg/ml de sangre. El polietanol-sulfato sódico que se encuentra en el comercio con el nombre de Liquoid, de la casa Hoffman La Roche, se ha utilizado ampliamente como anticoagulante, en especial en Europa.

Métodos físicos de anticoagulación

- **Frío:** la sangre recién extraída y llevada a 0 °C no se coagula, por lo que es posible mantenerla en ese estado durante bastante tiempo, incluso indefinidamente, si las condiciones de extracción y conservación son óptimas. En teoría, es la forma perfecta de mantener la sangre sin coagular; pero en la práctica es imposible realizar operaciones sucesivas a esta temperatura, y el plasma que puede separarse se coagulará con facilidad en cuanto suba la temperatura algunos grados. Además, a esta temperatura los elementos sanguíneos se perturban y los eritrocitos se hemolizan.
- **Fascos de paredes no humedecibles:** en estos casos la coagulación se retarda porque las plaquetas no encuentran una superficie a la cual adherirse, y por ello, no pueden liberar los factores que ayudan a la coagulación. Sin embargo, aunque la producción de tromboplastina se atrasa, al cabo del tiempo el proceso de coagulación se desencadena. Como se comprende, la sangre debe estar exenta de partículas de tejido y eritrocitos destrozados, por lo que las condiciones de extracción en este procedimiento deben ser rigurosas; para ello, se usa aguja siliconizada y tubos de vidrio siliconizados o parafinados.
- **Cristalería con silicona:** el empleo de cristalería tratada con silicona es indispensable en ciertos estudios sobre los trastornos de la coagulación. El empleo de esta cristalería suprime o disminuye mucho la pérdida de plaquetas. La cristalería limpia y seca (tubos y jeringas) se trata con una solución acuosa de un concentrado de silicona (por ejemplo, el "Siliclad" de Clay Adams), por inmersión en la solución durante cinco segundos o más. Luego, la cristalería se enjuaga cuidadosamente con agua y

se seca a temperatura ambiente durante 24 horas o, de preferencia, en un horno a 100 °C durante 10 minutos.

- **Desfibrinación:** cuando se requiere suero con urgencia o cuando se necesitan suero y eritrocitos, como en la investigación de ciertos tipos de anemias hemolíticas, la sangre se puede desfibrinar. Esto se puede realizar de dos formas:
 1. Inmediatamente después de obtenida la muestra, esta se coloca en frascos Erlenmeyer con perlas de vidrio. Luego, el Erlenmeyer se agita en forma de "ochos" durante 5-10 minutos. La fibrina se deposita alrededor de las perlas de vidrio.
 2. Emplear un Erlenmeyer con una varilla de vidrio, a la que se le ha pegado en uno de sus extremos (mediante calor) pequeños trozos de tubos capilares. En este caso, la sangre se mueve alrededor de la varilla central, con un movimiento de rotación moderadamente rápido del frasco. La coagulación por lo general se completa dentro de 5-8 minutos, y la mayoría de la fibrina se deposita alrededor del extremo erizado de la varilla.

La sangre desfibrada se puede poner en una centrífuga para obtener suero en forma rápida y en volúmenes relativamente grandes. Si la sangre se procesa con cuidado, la lisis es mínima. La morfología de los eritrocitos y leucocitos se preserva bien, sobre todo para frotis de concentrados de leucocitos para buscar células del lupus.

BIBLIOGRAFÍA

- Anderson A, San Martín A. Manual de laboratorio. 2 ed. Chile: Hospital Hernán Henríquez Aravena; 2012.
- Calam RR. Blood collection. En: Faulkner WR, Meites S. Selected methods for the small clinical chemistry laboratory. Washington: American Association for Clinical Chemistry; 1982. p. 3-10.
- Dosick H, Prasad B. Coulter S hematocrit and microhematocrit in polycythemia patients. Am J Hematol 1978; 5(1): 51-54.
- Fensner JH, Behrens JA, Detter JC, Cullen TC. Platelet counts in capillary blood. Am J Clin Pathol 1979; 72(3): 410-416.
- Nelson DA, Henry JD. Hematology and coagulation. En: Henry JB. Clinical diagnosis and management by laboratory methods. 16 ed. Philadelphia; Saunders Co; 1979. p. 557-1170.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). Serie de informes técnicos. N° 405. Anemias nutricionales. Ginebra: OMS; 1968.
- Raviña E. Medicamentos: un viaje a lo largo de la evolución del descubrimiento de fármacos. Universidad de Santiago de Compostela; 2008.
- Roca P, Oliver J, Rodríguez AM. Bioquímica, técnicas y métodos. Madrid: Editorial Hécice; 2003.
- Ruiz-Arguelles GJ, Sánchez-Medal L, Loria A, Piedras J, Córdova M. Red cell indices in normal adults residing at altitude from sea level to 2670 meters. Am J Hematol 1980; 8(3): 265-271.
- Sáenz GF, Quijano L. Principales valores del eritrón circulante en niños costarricenses recién nacidos. Rev Biol Trop 1970; 16(2): 267-274.
- Sáenz GF, Arroyo G, Valenciano E. Valores normales de hemoglobina y hematocrito en adultos. Rev Med Hosp Nal Niños 1971; 6(1): 53-59.
- Thomas WJ, Collins TM. Comparison of venipuncture blood counts with microcapillary measurement in screening for anemia in one year-old infants. J Pediatr 1982; 101(1): 32-38.

EL HEMOGRAMA MANUAL Y AUTOMATIZADO

*Dr. German F. Sáenz Renauld
Dra. Lidiette Salazar Palma
Dra. Melissa Granados Zamora*

EL HEMOGRAMA MANUAL**Cómputo de eritrocitos**

El cómputo de eritrocitos tiene mucho margen de error al efectuarse manualmente, por lo que se recomienda que en ausencia de contadores celulares electrónicos, este cómputo se obvie y no se realice.

Cómputo de leucocitos

La muestra ideal para este análisis es sangre total en EDTA. Como líquido de dilución se utiliza la solución de Türk. Esta es una solución hipotónica de ácido acético al 2% o 3% (la cual lisa los eritrocitos, pero no los leucocitos ni los eritroblastos), a la que se le adicionan algunas gotas de solución de azul de metileno o de

cristal violeta para teñir tenuemente los núcleos de los elementos nucleados. Para este recuento también se puede usar una solución de HCl 0,1 N.

Procedimiento

- 1) Colocar 400 μl de solución diluyente de leucocitos en un tubo de ensayo 10-12 x 75 mm.
- 2) Agregar 20 μl de sangre capilar o venosa.
- 3) Mezclar por inversión repetida (bloqueando el tubo con parafilm) o utilizar un mezclador mecánico.
- 4) Montar la cámara de Neubauer.
- 5) Dejar en reposo y hacer el cómputo, tal como se detalla a continuación.

Los leucocitos se cuentan en los 4 mm^2 de las esquinas del retículo (Figura N° 1).



Figura N° 1. Cámara de Neubauer.

Los cálculos se realizan de la siguiente forma:

Leucocitos contados en los cuatro cuadros de los ángulos (4 mm^2) = 280.

Dilución de la sangre = 1:20.

Profundidad de la cámara = 0,1 μl .

$$\frac{280 \times 10 \times 20}{4} = 14.000 \text{ leucocitos}/\mu\text{l}.$$

De manera abreviada se obtiene el número total de leucocitos por microlitro (μl), multiplicando el valor obtenido en los cuatro cuadros por 50.

Ejemplo:

$280 \times 50 = 14.000$ leucocitos / μ l.

El factor "50" deriva de los cálculos:

$$\frac{10 \times 20}{4}$$

Nota: El factor "50" es válido solo cuando la dilución que se emplea es 1:20.

Los leucocitos de cada cuadro se cuentan por aparte y no debe haber una diferencia mayor de 15 células entre un cuadro y otro; de lo contrario, significa que hubo una homogenización inadecuada de la sangre o que se llenó mal la cámara, lo que invalida el recuento.

Cuando hay leucopenia, debe utilizarse el doble de cantidad de sangre y efectuar el recuento de los 9 mm² de la cámara; los cálculos se efectúan dividiendo por nueve el número de leucocitos contados, y multiplicando estos por 100. Cuando hay leucocitosis altas (como sucede en la leucemia leucémica), las diluciones de sangre se hacen en la pipeta de eritrocitos. Si la sangre se diluye 1:100, el número de leucocitos se multiplica por 250 y se diluye 1:2000, y los leucocitos se multiplican por 500.

Esta técnica debe efectuarse con gran cuidado, a fin de no aumentar el error, ya que el método tiene errores inherentes. Cuando los cálculos no son normales, se recomienda contar los leucocitos en los 18 mm² y obtener un promedio de las células.

Valores normales

En adultos, el número de leucocitos oscila entre 5.000 y 10.000/ μ l en sangre capilar. Son un poco más bajos en sangre venosa (aproximadamente 500 células menos).

Cómputo de eritroblastos

En todo paciente que presenta eritroblastos en el frotis de sangre periférica, es indispensable efectuar un recuento de estos al practicar el leucograma, ya que la solución de Türk no lisa dichos elementos; por esta razón, se cuentan como leucocitos, elevando ficticiamente la cifra de los últimos. Para efectuar la corrección, es necesario contar por aparte los eritroblastos que aparecen al realizar el recuento diferencial de los leucocitos, con el fin de obtener su valor por microlitro y restarlo del cómputo de leucocitos.

Ejemplo:

Cómputo de leucocitos (incluye leucocitos y eritroblastos): 14.000/ μ l.

Número de eritroblastos por 100 leucocitos (recuento diferencial): 8.

Con los datos anteriores, por simple regla de tres, se obtiene el cómputo de eritroblastos por microlitro.

En 108 células (eritroblastos y leucocitos) hay 8 eritroblastos; en 14.000 células nucleadas hay X eritroblastos.

$$X = \frac{14.00 \times 8}{108}$$

X = 1.037 eritroblastos/ μ l

$14.000 - 1.037 = 13.000$ leucocitos/ μ l (redondeo).

El cómputo real de leucocitos es de 13.000 μ l.

Cómputo de eosinófilos

Aunque el recuento de eosinófilos se puede obtener en forma aproximada a partir del conteo total y diferencial de los leucocitos, las propiedades tintoriales de los eosinófilos hacen posible que estas células se puedan contar en forma directa y más segura en cámara cuenta glóbulos; el diluyente debe teñir en forma brillante los gránulos eosinófilos y, al mismo tiempo, lisar los eritrocitos y los otros leucocitos.

**Método de Randolph
(modificación por Pilot)**

Propilenglicol	50 ml
Floxina al 1% (en agua)	10 ml
Na ₂ CO ₃ al 10%	1 ml
Heparina	100 unidades
Agua destilada	40 ml

Es indispensable una cuidadosa medida del Na₂CO₃.

La solución anterior se filtra y se guarda en una botella bien tapada; esta permanece estable por un mes a temperatura ambiente. El propilenglicol lisa los eritrocitos; el Na₂CO₃ lisa los leucocitos, excepto los eosinófilos; la floxina tiñe de rojo los gránulos de los eosinófilos; y la heparina previene la aglutinación de los leucocitos.

Procedimiento

- 1) Realizar una dilución 1:10 de la sangre en EDTA con el líquido de dilución (1 uL de sangre con 10 uL de diluyente). Dejar en reposo por 15 minutos para que se verifique la lisis y la tinción.
- 2) Montar la cámara en ambos lados y contar los eosinófilos en el retículo completo de cada lado de la cámara con bajo poder (10X). Los eosinófilos aparecen de color rojo.
- 3) Para los cálculos, se divide el total de eosinófilos por 18 y se multiplica por 100 = eosinófilos por microlitro.

Comentarios

Para el recuento de eosinófilos se puede emplear tanto sangre venosa anticoagulada con EDTA, como sangre capilar. Si se usa la primera, el conteo debe efectuarse dentro de las cuatro horas siguientes a la recolección de la muestra, ya que si se deja más tiempo, el número de eosinófilos disminuye por lisis.

Debido al bajo número de células contadas, el error en el método directo es importante, por lo que se hace indispensable montar ambos lados de la cámara, a fin de reducir el error. Con este mismo fin, se recomienda efectuar el cómputo de eosinófilos en la cámara de conteo de Fuchs-Rosenthal, la cual tiene una profundidad de 0,2 mm y 16 cuadros de 1 mm² cada uno.

Método indirecto para eosinófilos

La distribución irregular de los eosinófilos en un frotis sanguíneo, hace inexacto el cálculo de su número absoluto a partir del cómputo de leucocitos y del porcentaje de estas células en el recuento diferencial. Para disminuir dicho error, se hace un recuento diferencial con base en 300 células, obteniendo así, un resultado bastante satisfactorio.

No existe relación alguna entre el número de eosinófilos y el número de leucocitos en circulación. En las manifestaciones alérgicas de todo tipo (bacterianas, parasitarias, alimenticias, medicamentosas, etc.), los eosinófilos pueden elevarse. Una disminución franca de estos en cualquier proceso agudo, infeccioso u orgánico, es de mal pronóstico para el paciente. En la fase aguda de una leucocitosis inflamatoria o infecciosa, los eosinófilos disminuyen y pueden faltar por completo (reacción de estrés); al comenzar la mejoría y la convalecencia, su cifra vuelve a incrementarse en sangre periférica y una ligera eosinofilia absoluta es frecuente. La disminución del número de eosinófilos después de una inyección de ACTH es una reacción específica de las funciones cortico-suprarrenales.

Valores de referencia

En ayunas = 70 a 440/μl (1-4%).

Después de comer = 25 a 300/μl (1-3%).

Estudio de eosinófilos en secreciones

La presencia de eosinófilos en el moco nasal es de gran ayuda en el diagnóstico de alergia respiratoria en adultos y niños mayores. Con frecuencia, se recomienda realizar un simple frotis de secreción nasal, especialmente si el cuadro se complica por infección aguda o crónica.

Cuando un proceso infeccioso complica la alergia del tracto respiratorio, los eosinófilos desaparecen por completo de la secreción durante el estado activo de la infección, pero reaparecen después de alcanzada la fase de resolución. Esto mismo suele suceder por baja inmunidad, hipogammaglobulinemia, mala nutrición u otros factores predisponentes. Todo ello podría explicar la falta de correlación absoluta entre eosinofilia nasal y padecimientos alérgicos respiratorios, pues en estos casos debería haberla casi siempre. Según opina el autor de la técnica que se describe a continuación, "si hay ausencia de eosinófilos y células cebadas en los intervalos entre catarros, la alergia puede ser excluida razonablemente".

Método de Hansel (modificado)**Reactivos**

Eosina al 0,5% en alcohol metílico.

Alcohol-acetona; 100 ml de metanol y 100 ml de acetona.

Solución de azul de metileno

Azul de metileno	0,3 g
Alcohol metílico	30 ml
H ₂ O destilada c.s.p	100 ml

Procedimiento

- 1) Hacer frotis de moco nasal en portaobjetos.
- 2) Dejar secar a temperatura ambiente.
- 3) Cubrir la muestra con eosina durante ocho minutos.
- 4) Decolorar muy rápidamente con la mezcla de alcohol-acetona y lavar con agua destilada. Este lavado se debe hacer con el portaobjeto en posición horizontal, de manera tal que quede agua sobre la muestra.

- 5) Adicionar unas gotas de azul de metileno y dejar ocho minutos.
- 6) Lavar con agua del tubo y dejar secar.
- 7) Observar primero a alto poder seco y luego en inmersión.
- 8) Tipo de reporte: porcentaje de eosinófilos en 500 células leucocíticas.

Cómputo de reticulocitos

Los reticulocitos son eritrocitos jóvenes que contienen restos de ARN y ribosomas, presentes en grandes cantidades en el citoplasma de sus precursores nucleados. Los ribosomas tienen la propiedad de precipitar cuando reaccionan con ciertos colorantes supravitales, como el azul cresil brillante o el nuevo azul de metileno, originando gránulos o filamentos de color azul. En una tinción corriente con derivados de Romanowsky (Wright o Leishman), los reticulocitos no presentan retículo, sino que aparecen como células con basofilia difusa.

Reactivos

Azul cresil brillante

Azul cresil brillante	1,0 g
Citrato trisódico dihidratado	0,4 g
Cloruro de sodio	0,9 g
Agua destilada	100 ml
FILTRAR	

Si se desea, agregar como preservativo 0,1 g de azida de sodio. La solución colorante se guarda en una botella ámbar a temperatura ambiente (reserva). Para no entorpecer su calidad óxido-reductásica, se usa un pequeño frasco gotero del que se toman las alícuotas necesarias para la tinción. En caso de que se presente alguna precipitación o turbiedad de la solución de reserva, esta se filtrará. Dicha solución es estable por varios meses a temperatura ambiente.

También puede usarse el nuevo azul de metileno "N" (índices de color 52030 o 927).

Nuevo azul metileno	1,0 g
Citrato trisódico a 3%	20,0 ml
Cloruro de sodio 0,9%	80,0 ml
Disolver bien y filtrar	

Método

- 1) En un tubo de ensayo pequeño, se mezcla igual

número de gotas de sangre y colorante y se deja en reposo durante un mínimo de 20 minutos a temperatura ambiente, o mejor aún, a 37 °C.

- 2) Mezclar de nuevo y preparar frotis delgados. Dejar secar.
- 3) Se elige un área del frotis donde las células no estén distorsionadas y la tinción sea buena. Un error común es hacer los frotis muy finos; sin embargo, en la zona escogida para el análisis, los eritrocitos deben estar uno a la par del otro y no superpuestos.

Valores normales

En adultos:

0,5-1,5%

50 a 100x 10⁹/L (50.000-100.000/μl)

En recién nacidos: 2,5-6,5% (en la tercera semana de vida se aplican los normales del adulto).

- 4) Con objetivo de inmersión y campo reducido, se cuenta el número de reticulocitos que hay por 1.000 eritrocitos (esto se logra colocando un disco de papel de aproximadamente 1,5 cm de diámetro, con una ranura central de unos 4 mm de longitud, en uno de los oculares del microscopio). Los reticulocitos se cuentan doblemente; es decir, como retis y como eritrocitos.
- 5) Reportar el número de reticulocitos por cada 100 eritrocitos o, en términos absolutos (por μl), hacer referencia al cómputo de eritrocitos de la siguiente forma:

Reticulocitos/μl =

$$\frac{\% \text{ de reticulocitos} \times \text{millones de eritrocitos } 10^6/\mu\text{l}}{100}$$

Observaciones

El volumen de sangre que se debe agregar a la solución colorante depende del hematocrito del paciente. La tinción de los reticulocitos no se afecta por variaciones relativamente pequeñas en la proporción de sangre y colorante. Cuando no hay anemia, se usan partes iguales de sangre y colorantes; pero si hay se agrega más cantidad de sangre que de colorante, y si la sangre es policitémica, se añade más colorante que sangre.

La HbH sufre desnaturalización en presencia de azul cresil brillante o del nuevo azul de metileno, lo que origina cuerpos de inclusión redondos, pequeños (como una bola de golf), que se tiñen de color azul

grisáceo. Lo anterior se produce cuando la mezcla sangre-colorante se incuba a 37 °C por determinado tiempo. Estos cuerpos de HbH son grandes y únicos, si el paciente ha sido esplenectomizado. Los cuerpos de Heinz asociados con otras patologías (deficiencia de G6PD, Hbs inestables, etc.) también se tiñen con los colorantes mencionados y se diferencian de los reticulocitos por no presentar el material retículo fino de estos, sino un único material de inclusión.

Si la glucosa sanguínea está presente en altas concentraciones, el retículo no se tiñe o lo hace muy pobremente. También el EDTA en exceso empobrece la tinción. Los cuerpos de inclusión desaparecen si se utiliza contratinción con Wright.

Interpretación del cómputo de reticulocitos

El número de reticulocitos en sangre periférica constituye el mejor índice de actividad eritropoyética (eritropoyesis eficaz) de la médula ósea, suponiendo que hay una liberación normal de estos elementos por parte de la médula y que permanecen en la circulación por un período normal. Dichas consideraciones no son siempre válidas cuando hay un estímulo eritropoyético incrementado que produce aumento de eritropoyetina, ya que esto conduce a una liberación prematura de los reticulocitos por parte de la médula ósea, con una sobrevida mayor de sangre periférica.

La acción primaria de la eritropoyetina consiste en promover la diferenciación de la célula tronco orientada a proeritroblasto y demás estadios madurativos de la serie roja. En casos muy severos, cuando la demanda de eritropoyetina es mayor, esta puede tener un efecto adicional que incluye una salida prematura de los reticulocitos a sangre periférica. Esta aceleración de la madurez y de la liberación determina que aparezcan en la sangre periférica grandes eritrocitos con basofilia difusa, los cuales en tinciones supravitales muestran más cantidad de retículo que los reticulocitos normales. A esas células se les ha denominado "reticulocitos de desviación" o "reticulocitos tempranos", que al ser eliminados de manera prematura de la médula, requieren de dos a tres días (en lugar de un día, que es lo común) para perder el retículo a través de los pasos sucesivos de la sangre por el bazo. Esto puede dar un número falsamente elevado, que no corresponde a la producción diaria real de estas células por la médula. Por lo tanto, debe corregirse de nuevo el recuento de reticulocitos en vista del mayor plazo para su maduración en la sangre periférica. Dicha corrección se efectúa siempre que haya un cómputo de reticulocitos elevados y que el frotis sanguíneo correspondiente muestre macrocitos con basofilia difusa.

Ejemplo: varón de 18 años con un hematocrito (Hto) de 15%, 30% de reticulocitos y frotis sanguíneo con marcada anisocitosis y poiquilocitosis, en el que se observan abundantes macrocitos con basofilia difusa. *Cómputo de reticulocitos corregido:*

$$\frac{\text{Hto pac.} \times \% \text{ reticulocitos}}{45}$$

$$\frac{15 \times 30}{45} = 9,9\%$$

La segunda corrección se hace dividiendo el valor del *cómputo de reticulocitos* corregido entre dos (promedio de sobrevida del reticulocito estimulado en la sangre periférica); esto da el *índice de producción reticulocitario*, que es un dato más fidedigno del número de reticulocitos que se vierten en la sangre cada día.

Ejemplo:

Para el caso anterior, el índice de producción reticulocitario da el siguiente valor:

$$\text{Índice de producción reticulocitario} = 9,9/2 = 4,45\%.$$

Un índice igual o superior a tres, junto con un nivel de bilirrubina normal o alto, por lo general indica estado hemolítico. El cómputo corregido de reticulocitos provee una evidencia presuntiva de la producción eritrocítica. El cómputo porcentual, por otra parte, es un índice de la sobrevida eritrocítica. Por ejemplo, un cómputo del 7% indicaría que un eritrocito de cada 15 tiene menos de uno o dos días de vida. La masa eritrocítica (eritrón circulante) en este ejemplo manifiesta un rápido recambio, por lo que el fenómeno hemolítico debe tomarse en cuenta como un factor significativo en la patogénesis de la anemia; un incremento sostenido del número de reticulocitos es una evidencia incontrovertible de una vida disminuida del eritrocito.

El índice reticulocitario se obtiene multiplicando el recuento de eritrocitos de un paciente, por un factor de corrección derivado del hematocrito de él (en este caso, la corrección incluye también el factor sobrevida).

Cómputo de plaquetas

Las plaquetas tienen un diámetro de 2 a 4 µm en los frotis teñidos y un volumen de 4 a 7 fl, y son las células más pequeñas de la sangre.

El recuento de plaquetas manuales es una labor delicada y debe dejarse en manos de personal experi-

mentado. Este análisis es de vital importancia para el diagnóstico de los trastornos de la hemostasia.

La extracción de sangre para el cómputo de plaquetas deber ser limpia y debe mezclarse con anticoagulantes sin tardar.

El cómputo de plaquetas se puede hacer en forma indirecta, determinando su proporción respecto a los eritrocitos, o directamente, contándolas en la cámara cuenta glóbulos. La principal objeción a este último procedimiento es que no es realizable con el objetivo de inmersión. Es por eso que algunos prefieren los métodos directos con alto poder seco, lo cual ha tomado especial arraigo en los últimos años. Por lo general, solo es de importancia clínica urgente la disminución muy acusada del número de plaquetas.

La sangre debe extraerse con una jeringa de plástico y una aguja de calibre 20. Es esencial que la punción sea limpia y que la sangre fluya a la jeringa lo más espontáneamente posible, sin producir espuma. La aguja se separa de la jeringa y el volumen de sangre requerido se depositará, sin hacer espuma, en un tubo con EDTA líquido (1,5-2,0 mg/ml de sangre). La sangre y el anticoagulante deben mezclarse de manera adecuada y sin demora. La estabilidad de las plaquetas en la sangre así anticoagulada es lo suficientemente buena como para poder trabajar con la muestra después de 12 horas, y aún más, si la sangre se mantiene a 4 °C.

Líquidos de dilución para los cómputos directos

Para el cómputo de plaquetas se pueden utilizar diferentes diluyentes. Los más utilizados son el de Dacie-Lewis (formol-citrato), el de Brecher-Cronkite (oxalato de amonio al 1%) y el Rees-Ecker (formol-citrato-azul cresil brillante). Con los dos primeros se obtienen óptimos resultados al usarse microscopio de contraste de fases. La cámara se examinará con alto poder seco y las plaquetas aparecen como pequeñas partículas de cierta refringencia. El método de Rees-Ecker, por su parte, tiene la ventaja de que las plaquetas se tiñen de azul, haciéndose más fácil su identificación. De acuerdo a la experiencia, este último método es el que mejores resultados da para el trabajo rutinario, si no se posee contraste de fases.

Método directo de Rees-Ecker

Diluyente:

Citrato trisódico, 2H ₂ O	3,8 g
Formol (40 p/v)	0,2 ml

Azul cresil brillante	0,1 g
Agua destilada c.s.p.	100 ml
FILTRAR	

Este diluyente se debe conservar en un frasco ámbar bien tapado y a temperatura ambiente. Para no contaminar grandes volúmenes del diluyente, se recomienda trasvasar lo necesario -previamente filtrado- a un tubo o vial del que se tomará la cantidad que se requiera para las diluciones del caso.

Procedimiento

- 1) Con una pipeta para eritrocitos se hace una dilución 1:200. Esta puede efectuarse agregando 0,02 ml de sangre anticoagulada a un tubo 10 x 75 mm, que contenga 4 ml del diluyente. Mezclar bien.
- 2) Se deja en reposo el tubo por unos 10 minutos. Al finalizar el tiempo se debe tener el cuidado de mezclar bien por inversión rotativa antes de pipetear.
- 3) Se llena la cámara de recuento.
- 4) La cámara se pone en cámara húmeda por unos 20-30 minutos, a fin de dejar sedimentar las plaquetas.
- 5) Las plaquetas son contadas en el cuadrulado central de 1 mm² (el cual se encuentra dividido en 25 cuadros más pequeños), con la ayuda del objetivo de alto poder seco (40, 45 X).

Cálculos

Si N es el número de plaquetas contadas en un área de 1 mm² (0,1 µl en volumen), el cómputo (µl) será:

$$= N \times 10 \times 200$$

$$= N \times 2000$$

Donde 10 corresponde a la profundidad de la cámara y 200 a la dilución.

En caso de sangres normales -en cuanto al número de plaquetas-, bastará contar las presentes en cuatro cuadrillos extremos y en el del centro de los 25 que constituyen el retículo central de 1 mm². Los cálculos se efectúan en la siguiente forma:

$$= N \times 5 \times 10 \times 200$$

$$= N \times 10.000$$

Este procedimiento funciona a la perfección en la práctica, y aunque tiene la desventaja de que no se eliminan los glóbulos rojos, las plaquetas se aprecian bien preservadas y claramente discernibles unas de

otras. Sin embargo, al igual que el método de formol-citrato para sangre total, no se recomienda para recuentos por debajo de 50.000/ μ l.

Método directo utilizando plasma

Básicamente, este método es el mismo que se ha descrito antes, sea que se utilice el diluyente de Rees-Ecker o el de Dacie-Lewis. La sangre se deja en reposo a temperatura ambiente, hasta que son visibles unos cuantos milímetros de plasma. Por medio de una pipeta se toman de forma cuidadosa 0,05 ml de este plasma que sobrenada y se diluyen en 0,95 ml del diluyente previamente depositado en el tubo pequeño (dilución 1:20). Se tapa bien con tapón de hule o plástico y se mezcla por inversión rotativa o en un mezclador hematológico. Luego, se procede igual que el método anterior.

Cálculos

Si N es el número de plaquetas contadas en un área de 1 mm² (0,1 μ l en volumen), el cómputo por μ l de sangre será:

$$= N \times 10 \times 20 \text{ (dilución)} \times \frac{100 - \text{Hto}}{100}$$

$$= N \times 200 \times \frac{100 - \text{Hto}}{100}$$

Cómputo indirecto de plaquetas. Método de Fonio

Este procedimiento es de gran utilidad en clínica, en especial para la valoración de plaquetas en muestras de sangre capilar, aunque también se utiliza en sangre venosa anticoagulada. El fundamento del método consiste en contar simultáneamente el número de plaquetas y el de eritrocitos, con objetivo de inmersión y campo visual reducido. Al llegarse a una cuenta de 1.000 – 2.000 eritrocitos, se harán las operaciones correspondientes para obtener el cómputo.

Procedimiento

- 1) Colocar una pequeña gota (0,05 ml) de EDTA al 2% sobre la yema del dedo.
- 2) Punzar la piel con lanceta grande a través de la gota de EDTA.
- 3) Dejar que la primera gota de sangre fluya espontáneamente (0,05 ml) y se mezcle con la gota del anticoagulante; o mejor aún, realizar la mezcla de inmediato con la ayuda del portaobjetos frotador. Practicar un par de extensiones. Limpiar bien la zona y obtener de la misma punción el índice hematocrito.

- 4) Teñir una extensión con Wright, extendiendo a unos 3-5 minutos más la tinción.
- 5) Reducir el campo visual de la inmersión, colocando un pequeño disco perforado de papel en el ocular, tal y como se indicó para el cómputo de reticulocitos.
- 6) Contar simultáneamente plaquetas y eritrocitos, hasta un total de 1.000-2.000 de estos últimos. Esta operación se hará en la zona intermedia del frotis.

Cálculos

Si se posee un cómputo de eritrocitos obtenido por método electrónico, entonces se realiza una regla de tres:

$$\begin{array}{l} N \text{ plaquetas} \dots\dots\dots 2.000 \text{ eritrocitos.} \\ X \text{ plaquetas}/\mu\text{l} \dots\dots\dots \text{cómputo de eritrocitos}/\mu\text{l.} \end{array}$$

de donde:

$$X = \frac{N \times \text{cómputo } \mu\text{l}}{2000}$$

Si no es posible contar con un cómputo exacto de eritrocitos, se utiliza el valor del Hto para obtenerlo, de acuerdo con la fórmula de Dannenberg. Esto se puede hacer siempre y cuando el valor del Hto no sea mayor a 55%, ni se trate de un síndrome talasémico. De otra forma, el valor obtenido será aproximado o semi-cuantitativo.

Este procedimiento da valores más aproximados a la realidad si se efectúa en extensiones sanguíneas practicadas a partir de sangre total anticoagulada con EDTA. El procedimiento y los cálculos son los mismos señalados arriba.

Valores de referencia

De acuerdo con la experiencia en el trabajo con métodos directos, el número de plaquetas por microlitro en condiciones normales se halla entre 200.000 y 500.000 (200 a 500 x 10⁹/L).

Con métodos indirectos (en especial, con sangre capilar) estos valores son algo menores: 180.000-450.000/ μ l.

Comentarios sobre el cómputo manual de plaquetas

- 1) El cómputo de plaquetas es una operación dificultosa, pues tienen un tamaño reducido, se aglutinan y desintegran con facilidad y tienden a

confundirse con artefactos a través del microscopio.

- 2) El cómputo de estos elementos es una operación minuciosa y se precisa cierta práctica antes de poder efectuarlo con toda corrección.
- 3) Definitivamente, los resultados son más satisfactorios y confiables si se hace punción venosa.
- 4) Si durante el cómputo se observan grumos de plaquetas, deberá repetirse la operación. Esto suele deberse a una extracción incorrecta o a una mezcla insuficiente de la sangre con EDTA.
- 5) Si el cómputo de plaquetas es muy alto, será conveniente hacer una dilución mayor (1:500, por ejemplo).
- 6) Cualquier dato trombocitopénico debe evaluarse con otro de los procedimientos señalados.
- 7) El margen de error del recuento de plaquetas (directo) está comprendido entre 16% y 25%. Si se utiliza contraste de fases, el margen de error es 8-10%. Puesto que los métodos directos tienen los mismos errores inherentes de los eritrocitos, se deben contar por lo menos 100 plaquetas en el número de cuadrículas (1 mm²) que sean requeridas, ya que de esta forma se disminuye el porcentaje de error a un 10%, mientras que si se cuentan solo 10 o 40 plaquetas, el error puede ser tan alto como 60% y 30%, respectivamente.
- 8) La apreciación del número de plaquetas en los frotis que forman parte de un hemograma, es un dato que siempre se debe reportar. Por lo general, un número mayor a 15 plaquetas por campo de inmersión indica que se encuentran normales (una plaqueta por cada 10 a 30 eritrocitos). Si sobrepasan de 50, es muy posible que se encuentren aumentadas. Además, este procedimiento permite identificar anomalías cualitativas de estos elementos, como: anisocitosis, plaquetas gigantes, azules, degranuladas, entre otros.
- 9) En la actualidad, existen sistemas electrónicos para el cómputo de plaquetas. Sin embargo, ante cualquier dificultad, se puede recurrir a los métodos convencionales mencionados.

Causas de error en cómputos manuales

Las causas de error en los recuentos celulares pueden dividirse en cuatro:

1. Errores en la toma de muestras

Sangre capilar

- (a) Punción superficial, lo que impide que la sangre fluya libremente.
- (b) Excesivo masaje o presión en el sitio de punción.
- (c) Edema, cianosis o inflamación del sitio de punción.

Sangre venosa

- (a) Uso prolongado del torniquete (produce estasis de la sangre).
- (b) Edema, cianosis o inflamación del sitio de punción.
- (c) Coagulación de la sangre.
- (d) Hemólisis.
- (e) Homogenización insuficiente de la sangre que se ha sedimentado.

2. Errores técnicos

- (a) Coagulación de la sangre en la pipeta por retardo en la dilución (sangre capilar).
- (b) Error de pipeteo.
- (c) Utilización de líquido de dilución contaminado con sangre.
- (d) Homogenización inadecuada de la sangre diluida.
- (e) No montar de inmediato la muestra en la cámara una vez que se ha homogenizado, ya que las células se sedimentan.
- (f) Inexactitud en los recuentos celulares.

3. Errores de equipo

- (a) Uso de cámaras de mala calidad, pipetas sin calibrar o cubreobjetos corrientes o rayados (el cubreobjetos debe ser grueso para que no se quiebre al presionarlo sobre la cámara).
- (b) Uso de cámaras, pipetas o cubreobjetos sucios.

4. Errores debidos a la distribución de células al azar

El error por la distribución de las células al azar no puede evitarse, pero sí disminuirse al contar mayor número de células.

ÍNDICES ERITROCÍTICOS DE APLICACIÓN CLÍNICA

Los valores eritrocíticos o valores del eritrón circulante, incluyen la determinación del número de eritrocitos por microlitro, el hematocrito y la medida de concentración de hemoglobina (Hb) expresada en g/dl. Estos datos obtenidos del hemograma permiten calcular índices hematimétricos de gran valor para el diagnóstico, clasificación y tratamiento de las anemias. Los índices eritrocíticos absolutos son: la Hb corpuscular media (HCM), el volumen corpuscular medio (VCM) y la concentración de Hb corpuscular media (CHCM). Estos índices se utilizan para definir el tamaño y el contenido de Hb de los eritrocitos, y son complementarios al análisis del frotis para morfología eritrocítica.

En general, se puede decir que los índices eritrocíticos absolutos en conjunto con la apariencia de los

eritrocitos en un frotis teñido, dan un cuadro más seguro de las constantes hematológicas y, por ende, de la cualidad del eritrón circulante. Es importante recalcar que si las determinaciones del hematocrito, hemoglobina y eritrocitos no están bien controladas, los índices hematimétricos darán valores falsos. Por este motivo, siempre se debe ver cuidadosamente la morfología de los eritrocitos en frotis, antes de dar un valor determinado.

Volumen corpuscular medio (VCM)

Es el volumen promedio de un glóbulo rojo expresado en fentolitros. Se obtiene dividiendo el valor del hematocrito, expresado en mililitros por 100 ml, por el número de eritrocitos en millones.

Si se acepta que en la sangre normal el número de eritrocitos es de 5 millones/ μl y el hematocrito de 45 ml/dl, resulta que en un microlitro de sangre los 5 millones de eritrocitos ocupan un volumen de 0,45 μl .

$$1 \mu\text{l} = 1.000.000.000 \text{ o } 10^9 \text{ fentolitros (fl)}$$

Por lo tanto, el volumen de una célula =

$$\frac{0,45 \times 10^9}{5 \times 10^6} = \frac{45}{5} \times 10 = 90 \text{ fl}$$

Ejemplo:

Hematocrito = 45 ml/dl

Eritrocitos por μl = 5.000.000

$$\frac{45 \times 10}{5,0} = 90 \mu\text{l}$$

*Los 5 millones de eritrocitos ocupan un volumen de 0,45 μl .

$$\text{VCM} = 90 \text{ fl}$$

En los analizadores la determinación del VCM se realiza directamente por medida del tamaño de cada glóbulo rojo (impulso eléctrico) y obteniendo el promedio; o derivado de la curva de distribución de los eritrocitos (histograma).

Interpretación

Cuando los glóbulos rojos son más grandes de lo normal, se dice que hay macrocitosis, y si coexiste anemia, se le llama anemia macrocítica.

Cuando son más pequeños, se dice que hay microcitosis, y a la anemia asociada se le designa como anemia microcítica.

En caso de que exista anemia, pero los glóbulos rojos sean de tamaño normal, la anemia se llama normocítica y los eritrocitos reciben el nombre de normocitos.

Valores de referencia

Los valores de referencia son: 105 μl al nacimiento, que desciende rápidamente al volumen propio de la infancia = 75 a 87 μl ; en los adultos las cifras normales oscilan entre 87 y 96 μl . Con los analizadores automatizados = 82-101 μl .

Hemoglobina corpuscular media (HCM)

Es la cantidad promedio de Hb contenida en un eritrocito, expresada en picogramos ($1 \times 10^{-10} \text{ g}$). Dicho en otras palabras, es el contenido medio en Hb (masa) del eritrocito.

Para calcular la HCM, se divide el valor de Hb en g/dl por el número de eritrocitos en millones por microlitro y se multiplica por 10.

Ejemplo:

Eritrocitos: 4.000.000/ μl

Hb: 12 g/dl

Entonces, 1 ml de sangre contiene $\frac{12 \text{ g}}{100}$ de Hb

1 μl contiene $\frac{12 \text{ g}}{100 \times 1.000}$ de Hb

1 μl contiene $\frac{12 \text{ g}}{100 \times 1.000 \times 4.000.000}$ de Hb

$$\frac{12 \text{ g}}{4 \times 10^{11}} = \frac{12 \times 10^{12} \text{ pg}}{4 \times 10^{11}}$$

$$\frac{12}{4} \times 10 \text{ pg} = 30 \text{ pg de Hb}$$

Interpretación

Un índice de HCM inferior, superior o dentro de los límites normales, correspondería a hipocromía en el primer caso y normocromía en los dos últimos casos. En eritrocitos macrocíticos, la cantidad de Hb puede ser mayor a la normal. El aumento de la Hb es paralelo al aumento del volumen globular y no refleja una sobresaturación con Hb. Por lo tanto, no procede emplear los términos hiperocrómicos y anemia hiperocrómica. Sin embargo, si la cantidad de Hb por glóbulo es menor de la normal, resulta hipocrómica, y si se acompaña de anemia es una anemia hipocrómica.

Si la cantidad se haya dentro de límites normales, el término correcto es normocrómico, y una anemia que acompaña a esta situación debiera denominarse normocrómica.

Valores de referencia

Al nacer es de 40 pg, cifra que desciende rápidamente al nivel propio de la infancia = 27 a 30 pg. En adultos es de 27 a 32 pg. Con el autoanalizador el valor es de 27-32 pg.

Concentración de Hb corpuscular media (CHCM)

Es la relación entre la concentración de Hb en g/dl y el hematocrito; es decir, la proporción de Hb (peso/volumen) contenida como promedio en los eritrocitos de una muestra de sangre.

Como se sabe, la cantidad de Hb se expresa en g/dl de sangre, sin hacer hincapié en que ella solo se encuentra en los glóbulos rojos. Si ahora se considera que en 100 ml de sangre (un dl) hay un valor hematocrito de 42 para la mujer, en realidad la cantidad de Hb corresponde a esta masa globular de 42 ml de sangre.

La cantidad de Hb contenida, no en un dl de sangre, sino en un dl de masa globular, corresponde a la concentración de Hb corpuscular media que se obtiene de la cantidad de Hb expresada en g/dl, dividida por el índice hematocrito y multiplicado todo por 100 para convertir el resultado en decilitros.

Ejemplo:

Hemoglobina = 16 g/dl

Hematocrito = 5 ml/dl

$$16 \times 100 = \frac{1600}{45} = 35,5$$

CHCM = 35,5 g/dl de eritrocitos empacados

Valores de referencia

En los niños, al nacer es de 35 g/dl, cifra que desciende rápidamente al nivel infantil normal: 30-32 g/dl; en adultos es de 31-35 g/dl. Con los autoanalizadores el rango es de 32-36 g/dl. Lo frecuente es observar disminuciones de la CHCM por encima de los valores normales en casos de esferocitosis hereditaria y de anemia megaloblástica.

La CHCM es el único índice válido cuando los valores se obtienen manualmente. Si se realiza en equipos automatizados, toma mayor validez el VCM y la HCM.

LAS ANEMIAS Y SU CLASIFICACIÓN MORFOLÓGICA

El término anemia se refiere a la reducción por debajo de los límites de referencia de la concentración de Hb. Las anemias se producen siempre que el equilibrio hemopoyético se halla perturbado y se pierde más Hb que la producida. La anemia en sí no es más que un signo (como la temperatura) y no constituye un diagnóstico. En tal sentido, la anemia siempre es secundaria.

Lo más importante en el estudio de las anemias es la determinación de las características morfológicas de los eritrocitos, así como la investigación de los mecanismos de producción de la enfermedad, ya que es imprescindible identificar la causa fundamental, objeto de diagnóstico.

En muchas anemias existen alteraciones características en el tamaño y en el contenido de Hb en los eritrocitos. De ahí que resulte conveniente la diferenciación morfológica de las anemias, ya que ello permite dirigir la investigación hacia un grupo definido de posibles factores causales y excluir otros. Para clasificar la anemia morfológicamente, se utilizan las fórmulas de Wintrobe (índices eritrocíticos) para VCM, HCM y CHCM y sus valores de referencia.

Con base en lo mencionado, las anemias se clasifican en cuatro tipos, tal como lo muestra el Cuadro N° 1.

Cuadro N° 1. Clasificación de las anemias según su morfología			
TIPO	VCM (fl)	HCM (pg)	CHCM (%)
Macroítica	Más de 99	Más de 32	34-37
Normocítica	82-98	27-32	32-35
Microcítica	Menos de 80	26-28	30-32
Microcítica hipocrómica	Menos de 80	16-26	Menos de 30

El estudio de las enfermedades de la sangre tiene su inicio en el laboratorio; de ahí que la primera clasificación que se haga de las anemias sea la morfológica. De ese estudio se puede concluir el tipo morfológico y la cualidad hemoglobínica de los eritrocitos, así como una clasificación más compleja de la anemia, al tomar en cuenta todos los datos que brinda el resultado de un hemograma completo. De esta manera, se observa que cuando hay un descenso proporcional del número de eritrocitos, de la hemoglobina y del hematocrito, generalmente no se modifica la forma, el tamaño ni la concentración de hemoglobina del eritrocito. En esta situación se habla de una anemia normocítica, normocrómica e hipocitémica.

Si por diversas causas se produce un descenso en el número de eritrocitos mayor que el de la hemoglobina o del hematocrito (eritrocitos macrocíticos o megalocíticos), se habla de anemia macrocítica e hipocitémica; el término hiperocrómica no se utiliza.

Ahora bien, cuando es mayor el descenso de la hemoglobina y del hematocrito que el número de eritrocitos (elementos microcíticos), se está ante el caso de una anemia microcítica, hipocrómica y normocitémica e incluso policitémica (como sucede en talasemia heterocigota).

Cuando ya no existe proporción entre la disminución de la hemoglobina y del hematocrito, porque la hemoglobina disminuye más que el hematocrito (deficiencia de hemoglobina), se está ante la presencia de las llamadas anemias hipocrómicas, que por lo general son microcíticas. En estos casos, la disminución del pigmento es proporcionalmente mayor a la disminución del número de células.

A pesar de que se tomen todas las precauciones, en ocasiones los índices absolutos no ayudan a esclarecer la verdadera condición morfológica de una anemia, motivo por el cual siempre debe recurrirse a estudios de frotis de sangre bien hechos. Se ha de comprender que las constantes hematimétricas son en realidad promedios de una población eritrocítica, que nunca es homogénea en sus características morfológicas o de contenido de hemoglobina. En realidad, el estudio de la citología periférica es de mayor valor que la misma determinación de los citados índices, toda vez que estos se encuentran sujetos a error si no se efectúan en analizadores electrónicos; mientras que un frotis bien hecho, bien teñido y bien observado, no lo está.

EL HEMOGRAMA AUTOMATIZADO

La demanda de análisis hematológicos y de laboratorio ha crecido necesaria e inevitablemente en el quehacer

médico; de hecho, el hemograma es el análisis más solicitado en los laboratorios a nivel mundial. En respuesta a esta demanda, se han desarrollado un gran número de instrumentos para realizar el trabajo diario en hematología, de manera rutinaria y especializada.

Actualmente, existen en el mercado infinidad de modelos que van desde simples contadores de células, hasta verdaderos analizadores que combinan distintas metodologías en un instrumento para reportar un hemograma casi completo. Se puede mencionar además el citómetro de flujo, un equipo de múltiples aplicaciones en hematología, así como en inmunología, citogenética, biología de plantas, patología y otras.

Los analizadores hematológicos comenzaron a desarrollarse a principios de la década de los 60, cuando Wallace y Joseph Coulter patentaron su equipo basado en el método de la impedancia eléctrica, únicamente para recuento de leucocitos y eritrocitos. Mantuvieron en exclusividad su manufactura hasta 1973, desarrollando y mejorando sus diseños. Posterior a esos años, otros fabricantes introdujeron nuevos modelos para contar plaquetas. A fines de los 70, comenzaron a incluirse nuevos parámetros hematológicos y ya por 1980 distintas casas introdujeron equipos que ofrecen diferencial de cinco partes y demás posibilidades para llevar sistemas de control de calidad y archivos diversos, además de permitir la manipulación de datos por análisis estadístico, en muestras y controles.

Los analizadores

Existen en estos equipos dos metodologías fundamentales para contar y analizar células:

- a. *Impedancia o resistencia eléctrica:* básicamente, las células son contadas y medidas por la resistencia eléctrica que producen al comportarse como partículas suspendidas en una solución diluyente conductora, al atravesar una pequeña apertura entre dos transductores. El flujo de células atraviesa la apertura y el paso de cada una interrumpe momentáneamente el paso de la corriente eléctrica entre los dos electrodos sumergidos a cada lado de la apertura. Ese cambio en el voltaje produce un pulso por cada célula y la altura de cada pulso es proporcional al volumen del diluyente desplazado y así, del volumen de cada célula. De esta manera, son contadas y medidas las tres poblaciones celulares sanguíneas.
- b. *Dispersión de luz láser o principio electro-óptico:* en este sistema las células circulan en un flujo continuo o discontinuo y dispersan la luz láser que las atraviesa a distintos ángulos, lo cual es registrado

por distintos detectores. De esta forma, no solo se cuenta el número de células, sino que también se obtienen datos de su tamaño y de su estructura interna, complejidad y granularidad. En algunos modelos esta metodología se combina con tinción citoquímica, para analizar el contenido enzimático y tener una clasificación más precisa.

Existen otras metodologías menos utilizadas, como la radiofrecuencia, la centrifugación y el análisis de capas, canales de lobularidad y citoquímica.

Por otra parte, cabe mencionar que los analizadores también incluyen el análisis de otros parámetros hematológicos como:

- a. *Determinación de hemoglobina:* se ha utilizado el método de referencia de la cianometahemoglobina, posterior a dilución y lisis de los eritrocitos y lectura a 540 nm, según la metodología tradicional, adaptada a la tecnología de cada fabricante. Actualmente otros instrumentos han sustituido la cianometahemoglobina por otro reactivo que elimina la toxicidad del cianuro, utilizando el laurilsulfato para formar el pigmento sulfoHb.
- b. *Determinación del hematocrito:* puede ser directo o indirecto. El indirecto se da en aquellos equipos que lo obtienen por cálculo matemático, de la medida del volumen de los eritrocitos (VCM) y el cómputo total de eritrocitos. Al no atrapar plasma en una medida macrovolumétrica, es por definición ligeramente menor que el manual, alrededor de 5%, en muestras normales. Existen equipos que lo calculan de forma directa al contar los glóbulos rojos en cierto volumen de plasma.
- c. *Índices hemáticos:*
 - **VCM:** volumen corpuscular medio, que corresponde al tamaño promedio de cada eritrocito, sacado directamente de la medida de cada pulso obtenido de la población de glóbulos rojos.
 - **HCM:** hemoglobina corpuscular media, calculada de la determinación de hemoglobina y el cómputo de eritrocitos; representa el promedio del contenido de hemoglobina en cada glóbulo rojo.
 - **CHCM:** calculado también de la determinación de hemoglobina y hematocrito. En la actualidad constituye un índice útil en casos de esferocitosis (alto) o en valores muy disminuidos (hipocromía), y si se trata del cálculo indirecto, ayuda en el control de operación del instrumento, al

involucrar en su cálculo el VCM y los eritrocitos.

- d. *Histogramas:* se refieren a curvas de distribución de las células por tamaño vs frecuencia, de las tres poblaciones sanguíneas. Permiten una apreciación gráfica de cada una de esas poblaciones, en cuanto a distribución, respecto a la normalidad. Se analiza el despliegue de cada histograma, el desplazamiento, la altura y la apertura de la curva, y la forma.
- e. *Recuento diferencial de leucocitos:* este ha sido el aporte más interesante y polémico de los analizadores en los últimos tiempos. Los equipos actuales analizan las poblaciones leucocitarias según su tamaño nuclear y los distribuyen gráficamente en los histogramas de volumen vs frecuencia. De estos derivan, por discriminadores móviles, los diferenciales de tres partes, en valores absolutos y porcentuales. En otros modelos, los diferenciales de cinco partes se obtienen sobre todo de los diagramas de dispersión por la luz láser, clasificados por tamaño y complejidad leucocitaria, los cuales se reportan también porcentual y absolutamente. Estos son los que se obtienen con otros recursos como la citoquímica, los canales de lobularidad y en otros modelos por radiofrecuencia.

Se han hecho estudios y evaluaciones de estos diferenciales y se cuestiona su utilidad en ciertas condiciones clínicas, especialmente los de tres partes. Algunos consideran que son métodos adecuados para poblaciones de pacientes sanos, pero que no son del todo confiables para pacientes hospitalarios o con sintomatología, al no detectarse en algunos modelos ciertas alteraciones celulares; en todo caso, estos cómputos diferenciales proveen una estimación rápida de la proporción de células que debe confirmarse por observación microscópica.

Complementando la información cuantitativa, los analizadores brindan además las “alarmas”, “banderas” o llamadas de atención, en cada uno de los tipos celulares, por medio de sistemas de claves de cada modelo o por mensajes en la pantalla del instrumento. Alertan así la presencia anormal o sospecha de desviación a la izquierda, granulocitos inmaduros, linfocitos atípicos, eritroblastos, blastos y otros, además de hacer una interpretación de las anomalías encontradas, dependiendo de la capacidad del modelo con que se trabaja. Por supuesto que existen casos de falsos positivos y negativos internacionalmente aceptados, cuyo grado certifica la categoría de instrumento, como su linealidad, arrastre, reproducibilidad, entre otros.

Es importante que todo centro asistencial establezca los parámetros que deben regir para realizar los diferenciales microscópicos, tomando en consideración aspectos como: la población consultante, la sensibilidad del instrumento, el sistema de alarmas de modelo, todo tipo de anormalidades que muestre el resultado automatizado, si son pacientes conocidos bajo control o que rara vez consultan, pacientes a internarse o internados en hospitales y otros criterios que brinden la seguridad de que los resultados finales son una contribución real al establecimiento del estado de salud-enfermedad de la persona en estudio.

f. *Otros parámetros en hemograma automatizado:*

- **ADE (ancho de distribución de eritrocitos) o RDW (del inglés “red blood cell distribution width”)**: amplitud de la distribución de eritrocitos según su tamaño; por lo general, es obtenido como una medida del coeficiente de variación, siendo el más conocido y evaluado; puede también expresarse como desviación estándar -ADE-CV o ADE-SD. Al ser una medida de la distribución de variabilidad del volumen de los eritrocitos, se asocia a la anisocitosis, según su alteración, y ha resultado útil en la clasificación morfológica de las anemias, aplicada principalmente para diferenciar en un inicio, deficiencia de hierro y talasemia, entre otras aplicaciones.
- **HDW (del inglés “haemoglobin distribution width”)**: amplitud de la distribución de la hemoglobina en cada eritrocito. Ha sido poco estudiado, pues pocos instrumentos lo proporcionan. Parece tener utilidad en problemas como la drepanocitosis.
- **VPM (volumen plaquetario medio)**: derivado del histograma de plaquetas. Representa el tamaño promedio de una plaqueta (8-12 fl); este se ha incluido en estudios comparativos de trastornos plaquetarios, pues existe una correlación inversa entre el número y el tamaño de las plaquetas. No ha sido aceptado aún como elemento diagnóstico.
- **PDW**: amplitud de la distribución por tamaño de las plaquetas. Se refiere a la variabilidad o anisocitosis de las plaquetas. Su información se ha planteado de utilidad en patologías como la púrpura trombocitopenica inmunológica.
- **PCT (plaquetocrito)**: obtenido electrónicamente de manera similar al hematocrito; se calcula relacionando el recuento de células con el volu-

men plaquetario medio (VPM). Da un estimado de la fracción del volumen sanguíneo total ocupada por las plaquetas. Suele incrementar sus valores en aquellos estados fisiológicos o patológicos que cursen con trombocitosis, aumentos del VPM o en ambos.

- **P-LCR (del inglés “platelet large cell ratio”)**: desarrollado por algunos fabricantes como un índice de plaquetas grandes, mayores de 12 fl.
- **MPXI**: índice de peroxidasa. En ciertos modelos aporta información en procesos inflamatorios, deficiencia de peroxidasa y otros.

Algunos analizadores hematológicos realizan la determinación automatizada de reticulocitos, cuyo recuento se reporta en porcentaje y en valores absolutos/ μ l; además, determinados instrumentos introducen la innovación de analizar los reticulocitos por contenido de ARN, reportándose en baja, mediana y alta fluorescencia, en relación directa a ese ARN y la madurez de reticulocitos, reportando así la fracción de reticulocitos inmaduros. Estos parámetros son de utilidad en el diagnóstico, tratamiento y seguimiento de pacientes con anemias hemolíticas, pacientes tratados con eritropoyetina por causas adversas, y en distintas hemopatías manejadas y evaluadas por la respuesta medular.

Estos nuevos parámetros son motivo de constante evaluación y su utilidad se prueba en patologías específicas o en asocio con otros datos, para interpretar determinadas condiciones.

También debe tenerse en consideración que existen una serie de interferencias que afectan positiva o negativamente cada parámetro. El usuario debe conocer estas posibilidades de cuándo un resultado puede verse afectado, aumentando o disminuyendo su valor y proceder a efectuar la medida correctiva que amerita cada caso. Ejemplos de estos son la pseudotrombocitopenia, la lipemia, muestras hemolizadas, las crioglobulinas, la presencia de heparina y otros.

En general, aparte de las características de cada modelo, según lo desarrollado que sea y los parámetros que brinde y las necesidades de cada usuario, los analizadores son capaces de realizar los análisis en pocos segundos (hay modelos con velocidades para 120 muestras por hora), y utilizan poca cantidad de muestra (de 30 a 20 μ l) de sangre anticoagulada con EDTA. Algunos cuentan con aspirador manual o muestreador automático en sistema cerrado o abierto, y un módulo para introducir muestras prediluidas, en casos pediátricos o de pacientes especiales. Tiene

distintos sistemas de identificación, hasta el más avanzado con código de barras. Los modelos más sencillos reportan ocho parámetros y los más complejos hasta 23. Cuentan con pantalla de resultados y otros datos que se anexan para el control del equipo y sistema de reporte impreso. Cuentan también con salidas para unirlos a programas de informática, para ampliar su capacidad estadística o poder conectarlos al sistema en red del laboratorio. De esta manera directa o a través de la computadora anexa, brindan un reporte impreso, en distintos formatos según las necesidades de la persona.

Evaluación de los analizadores

La evaluación continua que se hace de los analizadores incluye:

- a. Comparación con el método de referencia establecido para cada parámetro.
- b. Pruebas de consistencia interna de cada modelo, incluyendo precisión, estabilidad, exactitud, arrastre, linealidad, rapidez, etc.
- c. Un procedimiento para establecer valores normales.
- d. La determinación de la sensibilidad clínica del mecanismo que pretende el fabricante.
- e. Comparación de las tasas de falsos positivos y negativos con los métodos rutinarios utilizados en el laboratorio.

La confianza que se deposite en ellos dependerá de las características de cada instrumento, las expectativas del laboratorio usuario y la población de pacientes analizada, por lo cual cada centro debe establecer los criterios de utilización de su equipo, a fin de obtener los resultados deseados.

BIBLIOGRAFÍA

Bentley SA, Johnson A, Bishop CA. A parallel evaluation of four automated hematology analyzers. *Am J Clin Path* 1993; 100(6): 626-632.

Cartwright GE. *Diagnostic laboratory hematology*. 4 ed. New York: Grune & Stratton; 1968.

Dacie JM, Lewis SM. *Practical haematology*. 5 ed. England: Churchill Livingstone; 1975.

Duncan K, Gottfried E. Utility of the three part leucocyte differential count. *Am J Clin Path* 1987; 88(3): 308-313.

Fernández de Castro M, Vilorio A, Axpe M, Tenias J, Larrocha C, Jimenez C. Evaluación de autoanalizador hematológico Sysmex NE-8000. *Sangre* 1991; 36(5): 369-376.

Hernández L. Avances y aplicación clínica de la citometría hemática automatizada. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 2013; 29(1): 24-39.

Jones R, Faust A, Matthews R. Quality team approach in evaluating three automated hematology analyzers with five-part differential capability. *Am J Clin Path* 1995; 103(2): 159-166.

Jou J, Pastor C, Aymerich M, Villamor N, Reverter J, Bragues R, *et al*. Evaluación del analizador Sysmex NE-8000, según las normas del Comité Internacional de Estandarización de Hematología (ISCH). *Sangre* 1991; 36(5): 387-393.

Kairisto V, Kouri T, Rajamäki A, Virtanen A, Uusipaikka E, Nantö V. Quality control of multichannel hematology analyzers. *Am J Clin Path* 1992; 97(5): 645-651.

Rodak B. *Hematología, fundamentos y aplicaciones clínicas*. 2 ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2004.

Rothe M, Wingfield S, Barranco P, Charache S. Robotics in the hematology laboratory. An evaluation of the productivity of the Sysmex HS-330. *Am J Clin Path* 1995; 103(2): 154-158.

Ruiz-Argüelles G. Clinical utility of the laboratory reports provided by blood cell counters and blood film examination. *J Hematol* 2000; 2(1): 11-13.

Swaim W. Laboratory and clinical evaluation of blood cell differential counts. Comparison of the Coulter VCS, Technicon H-1, and 800-cell manual method. *Am J Clin Path* 1991; 95(3): 381-388.

*Dr. German F. Sáenz Renauld
Dr. Walter E. Rodríguez Romero*

INTRODUCCIÓN

En la actualidad existen diversos métodos para calcular el índice de hemoglobina (Hb) de la sangre. Los hay de tipo químico, basados en la determinación del hierro hemoglobínico, y los colorimétricos, basados en las reacciones coloreadas producidas por diversos reactivos y la hemoglobina (con el grupo HEME, específicamente). Estos últimos son los más usados por su sencillez y rapidez.

Con el método de la capacidad de oxígeno, los resultados obtenidos pueden expresarse en función del oxígeno como volúmenes por decilitro (dl); esto es, mililitros (ml) de oxígeno por decilitros de sangre. También pueden convertirse en gramos de Hb, utilizando el hecho aceptable de que un gramo (g) de Hb puede combinarse con 1,34 ml de oxígeno en condiciones óptimas. Así, una capacidad de oxígeno de 20 volúmenes por decilitro (capacidad normal), corresponde a un contenido de Hb de 20/1,34; es decir, 14,8 g/dl.

Otro método consiste en determinar el contenido total de hierro de la sangre. Para ello, se debe tener presente que el contenido de hierro de la Hb es de 0,347 g de hierro por 100 g de Hb, y que el hierro de la Hb representa de ordinario un 98% o más del hierro total de la sangre (cerca del 55% del eritrocito es hemoglobina).

En el caso de los métodos colorimétricos directos para la determinación de la Hb, estos van desde el más sencillo hasta el más complicado, con su correspondiente grado de exactitud. Así, por ejemplo, los métodos manuales sencillos adolecen de falta de exactitud o de concordancia entre los diferentes laboratorios.

La determinación de la concentración de hemoglobina (Hb) es uno de los análisis más practicados en el laboratorio clínico, y es fundamental en el diagnóstico de la anemia y la policitemia. Sin embargo, esta determinación, a pesar de su fácil procedimiento, se encuentra sujeta a una serie de variables, las cuales, de no tomarse en cuenta, afectan en forma considerable los resultados obtenidos. Por esta razón, en la década de los sesenta el Comité Internacional de Estandarización en Hematología adoptó como referencia el método de la cianometahemoglobina (HiCN cianometa

hemoglobina) para la determinación de la Hb. Casi de forma simultánea, la Organización Mundial de la Salud (OMS) definió al patrón HiCN de referencia como "Patrón de Referencia Internacional". En todos los analizadores automatizados para hemogramas se utiliza esta metodología o aquella que tiene como fundamento la formación de sulfohemoglobina. Esta última es utilizada por la mayoría de equipos automatizados de última generación.

REACCIONES Y PROPIEDADES DE LA HEMOGLOBINA

En general, se puede asumir que los diversos pigmentos de la Hb (HiCN, HbCO, HbO₂, entre otros) reaccionan de manera similar con las distintas pruebas que miden la concentración de la Hb en la sangre.

Las principales reacciones químicas de la Hb y de los compuestos hemoglobínicos relacionados, se resumen a continuación:

1. La actividad de la Hb, como pigmento respiratorio, se debe a su configuración molecular especializada. El enlace entre el hierro y el anillo de porfirina se encuentra en estado de resonancia; el hierro forma enlaces con el oxígeno, y el estado ferroso se mantiene tanto en la configuración oxi como en la desoxi.
2. La Hb se combina con el oxígeno molecular para formar oxihemoglobina (HbO₂).
3. Al exponer la HbO₂ ante agentes reductores tales como tartrato de amonio, hidrosulfito de sodio (ditiotionito), metabisulfito de sodio o sulfuro de amonio, el oxígeno se libera y se forma hemoglobina (reducida) desoxigenada.
4. La Hb se combina con el monóxido de carbono para formar carboxihemoglobina (HbCO).
5. Si la Hb se expone a la acción de agentes oxidantes, como ferricianuro de potasio o permanganato de potasio, el hierro se oxida pasando de ferroso a férrico, para formar metahemoglobina (Hi).
6. Si la metahemoglobina (Hi) se expone a la acción del cianuro de potasio, se forma cianometahemoglobina (HiCN).
7. Si la Hb se expone a la acción de ácidos o álcalis fuertes, habrá una desnaturalización, al liberarse la

molécula de globina para formar hematina ácida o alcalina, respectivamente.

8. La Hb reacciona con la piridina para formar hemo-cromógenos de piridina.
9. La Hb reacciona con la azida de sodio (NaN_3) para dar un pigmento que tiene el mismo espectro lumínico de la HiCN.

Todas estas propiedades mencionadas, así como otras, son importantes para entender la cuantificación de la Hb.

PROCEDIMIENTOS COLORIMÉTRICOS

Método manual para la determinación de la hemoglobina por HiCN

El método de la HiCN tiene como fundamento la conversión de la totalidad de la Hb en HiCN, cuya absorbancia es leída en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm. Dicha transformación se efectúa en dos etapas: en la primera, el ferricianuro potásico ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) pasa el Fe^{+2} a Fe^{+3} (Hi), y en la segunda, el cianuro potásico (KCN) convierte a la Hi (meta Hb) en HiCN (cianometa Hb). Todos los derivados de la Hb (Hb, HbO_2 , HbCO , Hi) son convertidos en HiCN, salvo la SHb (sulfo Hb).

Materiales

- **Sangre:** puede usarse indistintamente sangre total o capilar. No existe requisito alguno para el tipo de anticoagulante, aunque el recomendado es el EDTA.
- **Pipetas volumétricas** calibradas de cristal (de 5 ml, de preferencia no terminal) con precisión de $\pm 0,5\%$.
- **Micropipeta para Hb tipo Sahli:** se puede usar esta tradicional pipeta, que está calibrada para contener 0,020 ml (20 μl) (por esta razón, se le clasifica como pipeta TC, del inglés “to contain”). El uso de este tipo de pipeta requiere que la muestra biológica no se sobrepase de la marca, para no contaminar la luz de la pipeta, que no participa en la volumetría de los 20 μl . Es importante que el ajuste exacto de los 20 μl se realice con una toalla absorbente, y que a la vez, esta se use para limpiar bien el exterior de la pipeta. En todo caso, es deseable que la pipeta no se introduzca más allá de 2 mm en la muestra de sangre. Una vez realizado este procedimiento, su contenido debe ser depositado en el fondo del tubo que contiene el diluyente; se lava varias veces la luz de la pipeta, tratando de evitar que el diluyente sobrepase el aforo en esos repetidos lavados, pues

de otra forma se añadiría un factor de contaminación de la muestra respecto del volumen nominal.

Considerando que la pipeta de Sahli puede presentar problemas de pipeteo y error técnico, se puede utilizar también una micropipeta ajustable de 20 μl , la cual debe estar calibrada. En este caso se deben seguir los mismos cuidados que con la de Sahli.

- **Cubetas:** se deben utilizar cubetas calibradas y limpias, no deterioradas. Si se utilizan celdas cuadradas de 1.000 cm de paso de luz, la tolerancia debe ser de 0,50%; es decir, de 0,995 a 1,005 cm. Luego de utilizadas, deben lavarse con detergente y abundante agua destilada. Una vez a la semana, es aconsejable sumergirlas por 24-48 horas en mezcla sulfocrómica diluida.
- **Reactivo diluyente** (Drabkin, modificado por Van Kampen y Zijlstra) (VKZ):

$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (RA)	200 mg
KCN(RA)	50 mg
KH_2PO_4 (RA)	140 mg
Sterox SE (Harleco)	0,5 ml
H_2O destilada c.s.p.	1.000 ml

El ferrocianuro de potasio convierte la hemoglobina en metahemoglobina y el KCN en cianometahb. El sterox (o cualquier detergente iónico como el TritónX-100) elimina la turbiedad y hemoliza la muestra.

Las características físicas de este diluyente son las siguientes: color amarillo pálido, una transparencia absoluta, un pH de 7,2 (7,0-7,4), un espectro de absorción lumínica característico de la HiCN y una absorbancia a 540 nm de 0,00 medida contra H_2O destilada. Esta solución es estable por lo menos seis meses a temperatura ambiente, siempre y cuando se conserve en botellas de polietileno, aunque es preferible el uso de botellas de borosilicato marrón, ya que así se previene la pérdida de grupos CN^- ; de otra forma, se generaría más Hi que HiCN, por lo que los valores de Hb obtenidos serían inferiores a los reales.

Es importante recalcar que este diluyente de VKZ no debe congelarse ni mantenerse a una temperatura inferior a los 4 °C, porque si eso sucediera, el $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ se transformaría en $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, con una consiguiente oxidación parcial de la Hb a Hi.

La solución reactiva de VKZ, además de un pH óptimo para la reacción (7,0-7,4), incluye un detergente no iónico. Con ello se consigue disminuir el tiempo necesario para la conversión a HiCN y se facilita la hemólisis y la estromatólisis; asimismo, se evita la aparición de precipitados proteicos y, por lo tanto, turbidez. Estos aspectos favorables hacen que el uso del reactivo de VKZ permita obtener los valores de Hb en dos o tres minutos.

La calidad del reactivo de VKZ será producto del grado de pureza de los reactivos utilizados, de la exactitud del peso de estos, de la calidad del agua, del pH final de la solución y de los procedimientos de conservación que aseguren su estabilidad. Estas características se deben comprobar de la siguiente manera:

1. Su absorbancia a 540 nm debe ser de cero contra agua.
2. La capacidad de conversión de la Hb a HiCN debe ser óptima, con una razón entre 1,58 y 1,63, al dividirse la A^{540} sobre la A^{504} .
3. La A a 750 nm debe ser menor de 0,0002.

Procedimiento

Se pipetea 5 ml del reactivo de VKZ en un tubo de ensayo limpio. Se añaden 20 µl de sangre total bien homogenizada y se agita la mezcla vigorosamente. Se deja cinco minutos en reposo y se lee a 540 nm contra un blanco del reactivo. Se anota la absorbancia y luego esta se convierte en concentración, ya sea por medio de la curva de calibración, por un factor obtenido de ella misma o por el coeficiente de extinción (factor internacional).

Patrón o estándar de HiCN de referencia Internacional

Corresponde a una solución de HiCN producida bajo los auspicios de la OMS, por el *Dutch National Institute of Public Health and the Environment* (RIVM), de acuerdo con las instrucciones y especificaciones del *International Council for Standardization in Haematology* (ICSH), y que es remitida a todos los laboratorios que la soliciten.

Esta solución contiene entre 500 y 850 mg/L de HiCN; la concentración exacta de cada lote viene indicada siempre en el envase ampular sellado al vacío. El estándar de HiCN posee un espectro de absorción característico, con un pico máximo de 540 nm y una inflexión de 504 nm. Su valor correspondiente en gramos de Hb/L (g/L) puede calcularse multiplicando la

concentración de HiCN en mg/L indicada en la ampolla, por el factor de dilución (F), y dividiendo por 1.000.

Si la concentración de HiCN de la ampolla es de 602 mg/L y se diluye la sangre 251 veces, significa que tiene una concentración de Hb de:

$$\frac{602 \times 251}{1.000} = 151,10 \text{ g/L } (= 15,11 \text{ g/dl}).$$

Si la sangre se diluye 201 veces, la concentración sería de:

$$\frac{602 \times 201}{1.000} = 121 \text{ g/L } (=12,10 \text{ g/dl}).$$

El patrón HiCN de referencia, cuya estabilidad es por lo menos de dos años, puede ser empleado para las siguientes finalidades:

1. Hacer una curva de calibración.
2. Calcular la concentración de Hb de una muestra de sangre total.
3. Comprobar y verificar la fidelidad de los instrumentos de lectura.
4. Certificar la calidad de los patrones de HiCN producidos comercialmente o por instituciones de salud o de enseñanza.

Instrumentación

La medida de la A de las soluciones de HiCN puede realizarse mediante aparatos fotoeléctricos que permiten una lectura a 540 nm; se puede tratar de hemoglobímetro de lectura directa, fotolorímetros (filtro verde-amarillo) o de espectrofotómetros.

Curva de calibración

La gráfica patrón debe hacerse siempre que se utilice un fotómetro no calibrado previamente. Esta tiene como finalidad identificar la linealidad; es decir, determinar la correlación entre los valores de A y los de la concentración de Hb.

La curva se realiza preparando soluciones estándares de HiCN de concentración decreciente a partir del patrón de referencia, el cual se diluye con diluyente de VKZ, de acuerdo con lo señalado en el Cuadro N° 1.

Cuadro N° 1. Preparación de las soluciones patrón de HiCN para la elaborar la curva de calibración					
	g/dl de Hb				
Volúmenes de reactivo	15,1	7,6	5,0	2,5	Blanco
mL estándar (HiCN)*	3,0	1,5	1,0	0,5	
mL diluyente (VKZ)	-	1,5	2,0	2,5	3,0

* Ejemplo: concentración de 60,2 mg/dl $(60,2 \times 251) \div 1.000 = 15,10$ g/dl (a la dilución usual de 1/251).

La concentración de Hb de cada estándar secundario se calcula de acuerdo con el grado de dilución que ha sufrido el patrón primario concentrado. Luego de tres minutos, se procede a obtener las A de cada dilución contra blanco (del diluyente) o agua destilada, a 540 nm, partiendo de las lecturas de la cubeta cuatro, que es la de menor concentración. Por último, se representa gráficamente en papel semilogarítmico la relación entre los valores de A y los correspondientes valores de Hb, colocando en las ordenadas los valores de A y en las abscisas los de la Hb. Los diferentes puntos obtenidos deben quedar alineados entre sí y con el origen de las coordenadas. La linealidad es óptima hasta 24 g/dl.

Debe destacarse que tanto la solución concentrada de referencia como sus diluciones en VKZ son sumamente estables, y se han de leer a temperatura ambiente y guardarse en frasquitos estériles de color ámbar. Teniendo esto presente, en la práctica diaria, una vez demostrada la linealidad del método, basta con reiterar uno o dos valores de los patrones secundarios (por ejemplo, correspondientes a 10 y 15 g/dl de HiCN), para estar seguros de que se hizo una buena lectura de las incógnitas; así, no hay necesidad de establecer periódicamente toda la curva de calibración. La recomendación de efectuar esta última con cierta regularidad, no tiene más que un fin comercial.

Ahora bien, la mayoría de los patrones preparados comercialmente en el extranjero y aun el propio nacional, producido en la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica, contienen por lo general 80 mg (± 5) de HiCN por decilitro. En estas condiciones, las concentraciones equivalen a 20, 15, 10 y 5 g de Hb por decilitro, respectivamente, cuando la sangre se diluye 1/250 (= 1/251).

La concentración de los patrones se refiere a la concentración (mg/dl) de HiCN en las soluciones, como se explicó, para obtener los valores de la cantidad de

Hb en 100 ml de sangre sin diluir; los valores de los estándares se multiplican por el factor de dilución y el producto se divide entre 1.000. Si se agrega 0,020 ml de sangre a 5 ml del reactivo de VKZ, el factor de dilución es 251. Si se agrega 0,020 ml de sangre a 6 ml del reactivo de VKZ, el factor de dilución es de 301.

Por ejemplo, si la concentración del estándar de HiCN es de 80 mg/dl y la dilución es de 251, se tiene una concentración de Hb de 20 g/dl.

$$\frac{80 \text{ mg/dl} \times 251 (\text{factor de dilución})}{1.000} =$$

20,08 g de Hb/dl (para efectos prácticos = 20,0 g/dl)

Puntos de la curva de calibración:

1. *Tubo marcado 20 g/dl:* tiene 6 ml del patrón (20 g/dl), el cual mantiene su concentración (20 g/dl) al no diluirlo con VKZ.
2. *Tubo marcado 15 g/dl:* tiene 4,5 ml del patrón original (20 g/dl), el cual se diluye con 1,5 ml de VKZ; por tanto, es una dilución:
 $4,5 \div 6 = 0,75$; multiplicando este factor de dilución por la concentración: $0,75 \times 20 \text{ g} = 15 \text{ g/dl}$.
3. *Tubo marcado 10 g/dl:* tiene 3 ml del patrón original (20 g/dl), el cual se diluye con 3 ml de VKZ. Es una dilución $3/6 = 0,5$; multiplicándolo por la concentración original del patrón: $0,5 \times 20 \text{ g} = 10 \text{ g/dl}$.
4. *Tubo marcado 5 g/dl:* tiene 1,5 ml del patrón original (20 g/dl), el cual se diluye con 4,5 ml de VKZ. Es una dilución $1,5 \div 6 = 0,25$; multiplicando este factor de dilución por la concentración original del patrón: $0,25 \times 20 \text{ g} = 5 \text{ g/dl}$.

Cuantificación de la Hb con base en la curva de calibración

El valor de la Hb se obtiene directamente de la gráfica de calibración o a través de un factor de conversión (FC) derivado de ella. Esta última operación facilita el trabajo analítico. El factor se obtiene de la siguiente manera:

- Si la A del patrón secundario correspondiente a 10 g/dl fue de 0,180, entonces el factor será $(10 \div 0,180) = 55,55$; por lo que las A de las incógnitas se multiplicarán por ese factor para obtener la Hb en g/dl (o por 555,55 para g/L, o este por 0,0621 para reportarlas en mmol/L). Cabe destacar que la conversión de Hb en g/dl a Hb en mmol/L requiere del factor 0,6205.

Cuantificación de la HiCN con base en la extinción milimolar de la HiCN

La concentración de Hb como HiCN se obtiene directamente y con exactitud a partir de su coeficiente de absorción milimolar, por medio de la siguiente ecuación:

$$\text{Hb (g/dl)} = \frac{A^{540} \text{ HiCN} \times 16.114,5 \times F}{11,0 \times 1 \times 10 \times 1.000}$$

Donde:

- $A^{540} \text{ HiCN}$ = absorbancia de la solución de Hb a 540 nm.
- 16.114,5 = masa molecular relativa de la Hb derivada de $64,458 \div 4$.
- F = factor de dilución utilizado (por ejemplo, 1:251-20 μl de sangre en 5 ml de VKZ).
- 11,0 = $(E^{540} \text{ HiCN} \text{ coeficiente de extinción milimolar (derivado 44,0)}) \div 4$.
- 1 = paso de luz en cm (cubeta cuadrada; exactitud de tres puntos decimales).
- 10 = factor de conversión de 1 litro a 100 ml (dl).
- 1.000 = factor de conversión de miligramos a gramos.

De tal forma, el factor final es de 36,77; este se debe multiplicar por la absorbancia de la Hb:

$$\text{Hb g/dl} = A^{540} \text{ HiCN} \times 36,77.$$

Hb (mmol/l) = g/l $\times$ 0,0621 (si se expresa en estas unidades).

Es claro que cuando se utiliza este procedimiento espectrofotométrico de medición de la Hb, la calidad de lectura del aparato debe comprobarse regularmente con base en la solución Patrón Internacional de HiCN o la del país (CIANO-UCR).

Calibración de la pipeta

La calibración inexacta de la micropipeta constituye una importante fuente de error en la hemoglobinometría. Por tanto, es fundamental que este proceso sea realizado correctamente.

A continuación se indican dos procedimientos que sirven para calibrar cualquier pipeta o micropipeta.

• Método con mercurio

Se engrasa el émbolo de una jeringa de 2 ml, a fin de proveer un sello hermético. Se inserta el eje o espiga de la jeringa en un tapón de hule, al cual se le ha practicado un hueco adecuado para el propósito. El extremo superior de una pipeta es insertado en el otro lado (diámetro menor) del tapón de hule.

Se adapta el sistema (jeringa-tapón-pipeta) a una prensa universal o de cualquier otra forma, para que quede exactamente vertical.

Se coloca un poco de mercurio (Hg) seco en un *beaker* (vaso de precipitado) pequeño. La punta de la pipeta debe quedar ligeramente por debajo de la superficie del Hg, el cual es aspirado de forma lenta. Luego, se retira despacio con la mano el *beaker* de la pipeta. Se toma otro pequeño *beaker* y se expelle la totalidad del contenido de la pipeta con un movimiento cuidadoso del émbolo. En una balanza analítica se obtiene el peso del Hg y se divide por la densidad de este, a la temperatura del experimento. Esta simple operación permitirá obtener el volumen exacto de la micropipeta ($V=P/D$).

La densidad del Hg a $25 \pm 5^\circ\text{C}$ es de $13,5340 \pm 0,0123$ ($\pm 0,091\%$). Por lo tanto, para temperaturas entre 20 y 30°C , es suficientemente exacto usar la densidad de 25°C .

• Método espectrofotométrico

La pipeta o micropipeta también puede calibrarse por varios procedimientos titrimétricos o espectrofotométricos. Aquí se cita uno de ellos, el cual perfectamente puede emplearse en vez del gravimétrico.

Este consiste en utilizar una solución de ferricianuro de potasio al 4%. Así, por ejemplo, si se desea calibrar una micropipeta de 20 μl a 200 volúmenes de agua

(4,00 ml), para lograr una exacta macrodilución 1/201 se debe añadir 1,00 ml de la solución de ferricianuro en un frasco volumétrico de 200 ml, aforado de previo con agua.

La absorbancia de cada dilución se mide, entonces, en un espectrofotómetro a 420 nm, de preferencia en una cubeta cuadrada de 1.000 cm de paso de luz, contra agua como blanco. Se debe unir el promedio de tres determinaciones:

$$\frac{\text{Promedio A (micro)}}{\text{Promedio A (macro)}} \times \frac{\text{capacidad } (\mu\text{l})}{\text{nominal}} = \text{capacidad } (\mu\text{l}) \text{ real}$$

La incertidumbre permisible para una micropipeta de 20 μl o una pipeta de Sahli es de 1% o menos ($20 \pm 0,2 \mu\text{l}$).

CONTROL DE CALIDAD DE LA HEMOGLOBINOMETRÍA

La calidad de la hemoglobinometría se verifica mediante un hemolizado control (preparado por la Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica), de concentración conocido, el cual se introduce en el sistema a semejanza de una muestra. Dicho control se mide diariamente y su valor es anotado en un gráfico de control de calidad específico, con el propósito de dar seguimiento al proceso, al personal y a los aparatos.

La variación del valor medio del control fuera de las dos desviaciones estándar (DS), y tomando en cuenta los conceptos básicos sobre el control de calidad, implica una revisión de todos los pasos involucrados en la determinación de HiCN.

Este hemolizado puede utilizarse también para controlar el reactivo de VKZ preparado en el laboratorio, aplicando los criterios analíticos mencionados en relación con el espectro y la relación A^{540}/A^{504} .

En general, es importante señalar que el control de calidad de la determinación de la Hb, verifica todo el proceso desde la preparación del VKZ y la calibración de las pipetas Sahli o micropipetas, hasta la utilización de los hemolizados control.

El programa de control de calidad de un laboratorio debe iniciar en una revisión minuciosa del instrumental a utilizarse, el cual debe estar en perfecto funcionamiento. Posteriormente, una calibración de las pipetas por un método como el que aquí se preconiza. En este sentido, se deben revisar todas las pipetas que haya en el laboratorio y escoger las mejores para desarrollar el trabajo diario (exactitud $\pm 0,02A$).

En el caso de los analizadores automáticos, la casas fabricantes suelen ofrecer al laboratorio suspensiones para el control de la calidad, con valores bajos, medios y altos. Otras casas, como SYSMEX, tienen además

su propio control interlaboratorial de calidad, donde cada laboratorio con un equipo de esta casa comercial participa.

ERRORES EN LA HEMOGLOBINOMETRÍA

- **Inherentes a la muestra:** una venipuntura mal ejecutada (por estasis prolongada), lo cual eleva el índice de Hb. Lo mismo puede suceder con sangre capilar, con errores en cualquier dirección.
- **Inherentes al método:** el procedimiento de la HiCN ha demostrado ser el más adecuado. Si se siguen los lineamientos de normalización del método y las indicaciones del fabricante de aparatos automatizados, son poco probables los errores.
- **Inherentes al equipo y materiales:** debe tenerse sumo cuidado con el uso de pipetas y de cubetas. Con las primeras, debe contarse con una garantía de exactitud al menos inferior al 1%. Este tipo de material deberá ser escogido y separado del resto de las necesidades del laboratorio. Cuando se usa un fotómetro bien estandarizado y regularmente controlado, el error del método de la HiCN puede ser reducido a 2% (expresado como C.V.), por lo que este debe ser calibrado en el laboratorio antes de su empleo inicial y revisarse con frecuencia.
- **Errores del operador:** la mayoría de los errores humanos son los mismos en todos los procedimientos técnicos. Estos errores se incrementan con la fatiga y tienden a ser mayores casi al terminar el día laboral. Aquel operador que es paciente y crítico por naturaleza y por entrenamiento, y que se interesa no solo por el qué y el cómo de su trabajo, sino también por el por qué, tendrá menos opción de cometer errores que otro que no tenga esa misma actitud. Para evitar este tipo de error, es fundamental que el técnico sea una persona con amplia experiencia en la volumetría de precisión.
- **Otras fuentes de error:** hiperlipemia por quilomicrones, la cual se puede corregir eliminando el plasma lipérmico y sustituyéndolo por salina. Igual puede hacerse en aquellos pacientes

ocasionales con marcada paraproteinemia (mieloma, Waldenström). La modificación que aquí se introduce con el uso de la solución Drabkin de Van Kampen y Zijlstra, logra obviar la interferencia que antes se veía en muestras con marcada leucocitos. Sin embargo, en estas condiciones o en otras (presencia de Hbs S y C) donde se presente turbiedad, el problema se puede obviar al añadirse 5 ml de agua destilada al tubo de prueba, mezclarlo bien, volverlo a leer y multiplicar el resultado por dos.

Es importante mencionar que el uso de aparatos automatizados tiene la ventaja de eliminar los errores por pipeteo y de cubetas, así como gran parte de los errores humanos.

ESTABILIDAD DE LAS MUESTRAS

Los estudios de estabilidad efectuados indican que las muestras son estables, conservadas incluso a 4 °C, durante un máximo de una semana.

EXACTITUD Y PRECISIÓN

Si se emplea una pipeta exacta, no hay interferencias causadas por la lipemia y la estandarización de la técnica es correcta, la exactitud está limitada casi exclusivamente a la eventual presencia de pigmentos hemoglobínicos anormales (Hi y SHb).

Los coeficientes de absorción de la Hi y la SHb son iguales a los de la HbO₂ a 520 nm, y si la lectura se hace a 540 nm son, respectivamente, el 50% y el 65% de la HbO₂.

PAUTAS GENERALES PARA EL CONTROL DE CALIDAD DE LA HB Y OTROS ANALITOS (PARA PROCEDIMIENTOS MANUALES)

El rol básico del laboratorio clínico es proporcionar datos cualitativos y cuantitativos sobre especímenes biológicos, como ayuda a la prevención, el diagnóstico y el tratamiento de enfermedades humanas. Los análisis realizados por los laboratorios están sujetos a variaciones.

En general, todos los laboratorios deberían tener un sistema para evaluar la calidad de los trabajos. Al respecto, la experiencia ha demostrado que de los laboratorios que han aceptado este compromiso, muchos han elegido métodos de evaluación de la variación en los resultados que están diseñados para dar satisfacción y seguridad, más que para proporcionar una información fiel y completa de su calidad.

Fuentes de variación en el trabajo de los laboratorios clínicos

Existen tres posibles fuentes de variación del trabajo del laboratorio de salud: aleatorias, de precisión y de exactitud.

Error aleatorio

La primera fuente es la que se debe al error aleatorio, término utilizado por el uso familiar de la palabra "error" y por el término "aleatorio", que significa azar, lo impredecible. La habilidad para detectar estos errores por medio de técnicas de control de calidad es limitada, porque ellos se producirán, por naturaleza propia, al azar y en forma esporádica. Es importante el conocimiento de las fuentes posibles de tales errores y su prevención.

Los ejemplos incluyen:

- La equivocación al leer los instrumentos.
- Los errores aleatorios en los cálculos.
- Los errores de transcripción, con inclusión del cambio de dígitos (ejemplo: de 110 1 a 101).
- La ubicación incorrecta de un punto decimal (ejemplo: 11.0 y no 110).
- La utilización del material del paciente equivocado, debido al intercambio de especímenes.
- El uso de un reactivo o estándar preparado en forma incorrecta.

Precisión

Rara vez, en cualquier análisis realizado en condiciones ordinarias de trabajo, puede obtenerse repetidamente el mismo resultado sobre el mismo espécimen. Las medidas de precisión están relacionadas con el acuerdo entre análisis repetidos.

La precisión puede explicarse de manera cuantitativa en varias formas; la más usual es el de la desviación estándar (DS).

Exactitud

La exactitud se refiere a la relación de un conjunto de resultados con su valor real. Esta relación se mide en la forma más conveniente, al comparar la media de los análisis repetidos, con el valor real.

De acuerdo a lo mencionado, se pueden distinguir las siguientes fuentes de variación en los resultados analíticos:

1. *Error en el muestreo:* es un error inherente al método de muestreo; por ejemplo, el componente de

la muestra que se toma se afecta por un anticoagulante, por interferencia de drogas, etc.

2. *Error experimental al azar*: este error refleja variaciones en los resultados obtenidos de un método analítico cuando se hacen análisis sucesivos en la misma muestra, exactamente de la misma manera y por el mismo analista; por ejemplo, si el analista hizo un análisis por duplicado de Hb, sus resultados podrían ser 9,5 y 10,0 g/dl.
3. *Error experimental sistemático debido a la desviación propia del método*: es cuando un método determinado da resultados más bajos o más altos que otro método analítico. Esto puede deberse a variaciones en métodos basados en los mismos principios (por ejemplo, Hb por HiCN o por OxiHb) o en métodos basados en principios diferentes, pero que utilizan el mismo componente para medir (por ejemplo, Hb por HiCN o por capacidad de combinación con el O₂).
4. *Desviación personal del analista (error sistemático del analista)*. En este error, el analista inconscientemente introduce una variación constante en sus resultados; sin embargo, esta variación difiere de la que introduciría, de manera también inconsciente, otro analista que usara un método idéntico en el mismo laboratorio. Por ejemplo, un analista podría usar la marca del menisco en la pipeta Sahli, constantemente más baja que la que usara otro analista.
5. *Desviación del laboratorio*: esta puede provenir de diferencias que surgen de factores como reactivos, aparato, ambiente y métodos. De estas diferencias puede resultar una desviación hacia arriba o hacia abajo en relación con los resultados que se obtendrían en un laboratorio distinto, por el mismo analista, con el uso de técnicas y equipo similares.

Otras fuentes de variabilidad

- *Variación de muestra a muestra en un paciente* (de hora en hora, de día en día o según la estación del año).
- *Variación de paciente a paciente* (grupo étnico, edad, sexo, estado de salud).

HEMATOCRITO

Al igual que la Hb, en la actualidad el índice hematocrítico se obtiene en forma automática con los analizadores electrónicos. Sin embargo, en este apartado se consigna la metodología clásica para su determinación.

El método recomendado por el Comité Internacional para la Estandarización en Hematología (ICSH) es el que se basa en la centrifugación de una muestra de sangre anticoagulada y la posterior medición del paquete eritrocítico respecto al volumen total (eritrocitos y plasma). El principio físico de esta técnica se encuentra en la mayor gravedad y peso específico de las células con relación al plasma que las rodea; esto permite que al ser sometidas a un proceso de centrifugación, se dé una sedimentación al fondo del tubo. La velocidad de sedimentación depende fundamentalmente de la fuerza centrífuga, la cual, a su vez, depende de las revoluciones por minuto y del radio del rotor; dicha fuerza se expresa en la siguiente ecuación: $FCR: 0,0001118 \times \text{radio (cm)} \times (\text{rpm})^2$. Además de esta, también ejerce influencia la densidad y el tamaño de las células, la viscosidad del plasma y la densidad relativa entre las células y el plasma.

Los dos procedimientos relacionados con la centrifugación (el microhematocrito en tubos capilares y el macrométodo en tubos de Wintrobe) se consideran métodos directos en la medida del hematocrito. Ambas técnicas son reproducibles, pero presentan el inconveniente de que el plasma queda atrapado entre las células de la columna de eritrocitos, lo que evidencia una gran influencia sobre el valor real del hematocrito. En la realidad clínica, este fenómeno no es tan crítico, pero sí lo es cuando se requiere valorar exactitud y precisión. En algunas circunstancias, el porcentaje "normal" de plasma atrapado, que es de 3%, se sobrepasa, como ocurre en talasemias, esferocitosis, deficiencia de hierro y anemia drepanocítica (en esta última puede ser tan alto como 20%).

Otros métodos utilizados para evaluar el índice hematocrítico, son aquellos que no están fundamentados en la centrifugación, sino en la conductividad eléctrica, o bien, en el desplazamiento de volumen. Con algunos contadores electrónicos, el hematocrito puede derivarse indirectamente a partir del conteo de eritrocitos y del volumen corpuscular medio (VCM). Este hematocrito indirecto por lo general es 1,5-3% más bajo que el obtenido por micro capilares, debido a que se elimina el error introducido por el plasma entrapado y por una inadecuada oxigenación.

Macrométodo o método de Wintrobe

Este método ha caído en desuso, por la cantidad de muestra que requiere, el uso de tubos especiales y ciertos problemas prácticos. Para realizar la metodología se requiere de sangre anticoagulada en EDTA (1,5 mg/ml) o heparina (15-20 UI/ml), con un período de extracción no mayor a seis horas y conservada en refrigeración a 4 °C.

Al proceder a montar este macrométodo, es necesario que se tomen precauciones para no incurrir en errores que alteren la determinación, como lo es la correcta homogenización de la muestra por inversión repetida (30 veces), así como los referentes a la toma de esta.

Procedimiento

1. Mediante una pipeta Pasteur se procede a llenar el tubo de Wintrobe, evitando la formación de burbujas de aire; finalmente se enrasa hasta la marca de 100 mm.
2. La centrifugación del tubo se hace por 30 minutos a 300 g (aproximadamente 3.000 rpm en una centrífuga de 15 cm de radio). Es importante reiterar que se deben calcular las revoluciones por minuto para cada aparato. Este tiempo es bastante apropiado para obtener un buen empaquetamiento celular de las revoluciones. Una centrifugación adicional modificará la lectura en un 0,5-1% del volumen celular.
3. La lectura debe realizarse en los tubos sin frenar la centrifuga (detención espontánea) y no se debe incluir el paquete de leucocitos y plaquetas. El reporte, tanto en esta técnica como en el micrométodo, es de mililitros de glóbulos rojos por 100 ml de sangre total (ml/dl). El resultado se puede calcular mediante la fórmula:

$$\text{Hto} = \frac{A_1 \times 100}{A_2}$$

donde A_1 es la altura de la columna de eritrocitos en mm y A_2 es la altura de la columna total de sangre. Esta fórmula se aplica cuando la A_2 no corresponde al aforo correcto superior (10 = 100). También se utiliza para microcapilares cuando no se posee el lector correspondiente.

De acuerdo con el Sistema Internacional de Unidades (SI), el Hto debe reportarse en L/L o simplemente la razón sin unidad. Sin embargo, la costumbre todavía condiciona nuestra mente para describirlo como ml/dl o en porcentaje.

De los errores que modifican la información real que puede dar el hematocrito de Wintrobe, se aplican en general los mencionados para la microdeterminación de este. El tiempo de centrifugación adquiere importancia vital aquí, dado que si es insuficiente no se logrará el debido empaquetamiento celular, sobre todo con hematocritos superiores a 55 ml/dl; para estos se requerirá de una centrifugación adicional de 30 minutos, ya que el radio es menor en relación con los rangos normales o en anémicos.

Quizás uno de los aspectos más relevantes es la valoración del plasma atrapado en la columna de

eritrocitos, de la cual ya se ha descrito su influencia en el valor del Hto, e indirectamente de la concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM), que se calcula haciendo uso de él y de la Hb.

Microhematocrito

Es la técnica más utilizada por su rapidez, sencillez y reproductibilidad. Además, ofrece la ventaja de que se puede utilizar sangre obtenida por función dactilar con el uso de capilares heparinizados (2 UI de heparina), así como de muestras venosas tomadas con anticoagulantes EDTA. Es una técnica que requiere como mínimo un volumen de 50 µl de sangre para su determinación. En este método se utilizan capilares de 75 mm x 1,2-1,5 mm con o sin heparina. Los que poseen heparina han sido identificados con una banda roja en uno de sus extremos y los que no la contienen con una banda azul.

Una vez lleno el capilar (duplicado) se sella con una llama, o bien, con plasticina; este debe quedar lleno unas tres cuartas partes de su volumen total. En estos casos, se requiere de una centrífuga especial, cuyo radio sea superior a los 8 cm y que pueda mantener una fuerza constante de aproximadamente 10.000-15.000 g en su periferia, la cual se debe mantener durante los cinco minutos de funcionamiento; es esencial que la temperatura del aparato no sobrepase los 35 °C.

El capilar centrifugado se lee un apartado de lectura adecuado, que en general lo que expresa es el porcentaje que equivale a los eritrocitos empacados. El Hto se reporta en porcentaje o en ml/dl.

Es indispensable tomar en consideración que si se utiliza la punción capilar, se deben descartar las dos primeras gotas, para evitar al máximo la estasis sanguínea y mantener la relación de anticoagulante/sangre en las proporciones adecuadas. También es importante la presencia de un volumen de aire igual a la cantidad de sangre adicionada al tubo, para permitir una buena oxigenación de la sangre durante la homogenización de la muestra, puesto que el grado de oxigenación de la sangre afecta el resultado, de forma tal que el hematocrito de sangre venosa se muestra un 2% más alto que el de una sangre bien oxigenada (la cual ha perdido CO₂ y tomado O₂).

La cantidad de plasma atrapado es mayor en hematocritos altos que en bajos, y es mayor con el Wintrobe que con el micrométodo. Con este último, el plasma intercelular atrapado comprende un 3% de la columna eritrocítica en hipocrómicas y en anemia drepanocítica. De nuevo, el micrométodo se prefiere sobre el Wintrobe bajo estas circunstancias, toda vez que presenta menor error por plasma atrapado y es más rápido.

Cabe resaltar que la determinación del hematocrito por parte de los equipos automatizados no tiene relación con el concepto de “volumen empacado de eritrocitos”.

Conductividad eléctrica

Existen dos formas. La primera está fundamentada en la propiedad de conductividad del plasma en contraste con la resistencia ofrecida por los eritrocitos. Entonces, la dificultad u obstáculo ofrecido es proporcional al volumen existente de glóbulos rojos. Es un procedimiento que se ve afectado por varias situaciones, como desórdenes electrolíticos, de proteínas, inyección de medicamentos, aumentos significativos de plaquetas y leucocitos, o cuando se utiliza un exceso de anticoagulante (EDTA).

En la segunda el principio es contar partículas o glóbulos rojos en suspensión cuando estos atraviesan un orificio. Al ocurrir dicho fenómeno, se opera un desplazamiento similar de electrolitos y cambia la resistencia en el paso de corriente, lo que corresponde a cambios de corriente y de voltaje. La cantidad (magnitud) de esos cambios es directamente proporcional al tamaño volumétrico de la partícula o célula, y el número de cambios en un período específico es proporcional al número de partículas o células en la suspensión.

En la actualidad existen varios modelos de conductividad eléctrica. En Costa Rica se encuentran aparatos de la Coulter Electronics, Sysmex, Sequola y otros. Es importante recordar que el Hto por estos métodos es generalmente de 1,5-3,0% más bajo que el determinado por el microhematocrito. Equipos como el SYSMEX incorporan tecnología láser adicional a la conductividad eléctrica.

Datos obtenidos del hematocrito

- **Capa de eritrocitos:** su tamaño varía según el estado del eritrón circulante (número, forma y tamaño de los eritrocitos). Es bajo en la anemia y alto en las policitemias y en las hemoconcentraciones. La relación entre el espesor de la capa eritrocitaria y la cantidad de hemoglobina es también directa y muy precisa, y la altura de la columna de los eritrocitos sigue con muy poca variación. Para un mismo número de estos por microlitro, se comprende que el índice hematocrito sea mayor cuando el VCM también lo sea (por ejemplo, por proceder de una anemia macrocítica) y que lo mismo ocurra con el contenido hemoglobínico. En los casos de policitemia (Hto, mayor de 55%), la altura de la columna roja está aumentada, a veces de modo considerable; igual ocurre en situaciones de eritrocitosis pura.
- **Capa de leucocitos y plaquetas:** es de color grisáceo y de situación intermedia entre la inferior eritrocitaria y la superior de plasma. Su altura depende del número de leucocitos y de plaquetas, así como del tamaño de sus elementos. Se encuentra ampliada en las leucocitosis. Los elementos mieloides granulocíticos, por lo general de mayor tamaño que los linfocíticos, dan mayor espesor a esta capa, la cual disminuye en las leucopenias y trombocitopenias. Cuando existe un aumento de plaquetas, el grosor de dicha capa puede deberse a la acumulación de estos elementos, y a veces se ve en esta zona trombocítica un color amarillento que puede diferenciarse del estrato gris subyacente, puramente leucocitario.
- **Volumen plasmático:** en condiciones normales, constituye alrededor de un 50-60% de la altura total. El color del plasma es ligeramente amarillento y su aspecto puede ser algo turbio. En las anemias por algunas enfermedades infecciosas y, en general, en todas las anemias ferropénicas, indiferentemente de su causa, el color del plasma no acostumbra variar o es más pálido. En el caso de los síndromes ictericos, ofrece un franco color amarillo (bilirrubina). En ictericia hemolítica, anemia megaloblástica o enfermedades hepáticas con estados subictéricos, el color amarillento del plasma revela la existencia de una ictericia subclínica, muchas veces no evidenciable por la sola observación del paciente. Cuando el plasma es muy turbio suele deberse a una hiperlipoproteinemia, primaria o secundaria. Cuando hay hemólisis el plasma se puede visualizar con un tinte rosado.

Observaciones

Como cualquier procedimiento en donde se encuentra involucrado el hombre, esta técnica se halla sujeta a errores; por ejemplo, producidos por un mal manejo de la muestra sanguínea o bien, por el tipo de capilar utilizado. Haciendo referencia a la primera (Wintrobe), se pueden mencionar entre ellos:

1. Homogenización de las muestras en forma defectuosa o incompleta.
2. Exceso de anticoagulante respecto al volumen sanguíneo. Una concentración de EDTA superior a 1,7 mg/dl produce variaciones celulares que afectan el volumen (contracción celular).
3. Variación en el grado de oxigenación de la muestra. La sangre venosa posee un Hto 2% superior a la sangre arterial.
4. En cuanto al método capilar, se introduce error por técnica defectuosa en el llenado y cierre de los capilares y su respectiva lectura, en especial

en pacientes con leucocitos extrema, donde esta última se dificulta.

Tal vez, la mayor causa de error en el micrométodo sea la variación del calibre de los capilares. Según sea el calibre del tubo, así se obtienen diferentes variaciones, que pueden llegar hasta un 7,5%.

En relación con las ventajas del micrométodo, el volumen tan pequeño de sangre es una de las mayores, además de su sencillez, exactitud, rapidez y reproducibilidad, la cual es de aproximadamente 1,5%; también la facilidad de hacer la determinación por duplicado y a la cabecera del paciente, si fuere del caso.

En cuanto a los valores del índice hematocrito, son ligeramente más altos por el método de Wintrobe en comparación con el de los capilares. En parte, esto

se puede deber a que con el uso de los capilares el empaquetamiento es más completo y queda poco plasma intercelular.

Un error total que se presenta en la determinación del índice hematocrito es aproximadamente $\pm 1,15\%$. Comparando con el error que se encuentra en la mayoría de los procedimientos de laboratorio, este es extremadamente pequeño, por ejemplo, con los errores que se obtienen en la determinación del cómputo de eritrocitos y en la determinación de la hemoglobina. Se concluye que el micrométodo es el mejor procedimiento del que se dispone para la determinación de anemia o policitemia y, además, el más simple de los tres y el que menos tiempo consume.

En el Cuadro N° 2 se detallan algunos valores de referencia del hematocrito.

Cuadro N° 2. Hematocrito: valores normales o de referencia	
Cordón (micro)	48 $\pm$ 5 ml/dl
Venosa (micro)	57 $\pm$ 5 ml/dl recién nacidos
Capilar (micro)	65 $\pm$ 7ml/dl
Niños (1 año)	35 $\pm$ 2ml/dl
Niños (10 años)	38 $\pm$ 2ml/dl
Adultos:	
Hombres	43-45 (48,7 $\bar{x}$)
Mujeres	38-47 (43,6 $\bar{x}$)

COMENTARIOS FINALES

Se describieron en este capítulo algunos conceptos sobre la determinación del volumen eritrocítico empaquetado o hematocrito, con el fin de conocer las técnicas, sus detalles, los defectos y las ventajas.

La anemia es quizás uno de los problemas que más afecta a nuestros países, por lo que se hace necesario el establecimiento de una metodología adecuada para su diagnóstico. En algunas ocasiones, se ha discutido si la determinación de Hb sustituye al Hto o viceversa. En realidad, lo recomendable con métodos manuales es hacer ambos, ya que da el valor del CHCM, que brinda información adicional importante. Si con la metodología manual hubiese que escoger entre Hb o Hto, diremos que la Hb se halla sujeta a un mayor número de posibilidades de error, las cuales involucran: manejo de la muestra, pipeteo del reactivo, instrumentación, calibración general, etc. Para el Hto serían menos los errores técnicos y humanos en los que se podría incurrir. Sin embargo, desde el punto de vista económico,

pareciera ser de menor costo la determinación de la Hb. De ser así, se podría confiar en ella bajo un estricto control de calidad de la hemoglobímetría. En todo caso y dada la interferencia en el valor del Hto (por el plasma atrapado), pareciera justificado que sea la determinación de la Hb el método electivo para conocer realmente los valores del eritrón circulante, en especial en población pediátrica, que es donde se diagnostican padecimientos como esferocitosis hereditaria, talasemias de cualquier combinación genética, anemia hipocrómica y drepanocitosis y otros síndromes por Hbs anormales insolubles, solas o en combinación con genes talasémicos.

En todo caso, con el uso en Costa Rica de analizadores automatizados, la información que estos equipos brindan supera en mucho lo que se obtiene manualmente, y analizar todas las variables que estos ofrecen es de vital importancia. Las determinaciones de la Hb y del hematocrito, el cómputo de eritrocitos y los índices eritrocíticos -VCM; HCM; CHCM y RDW-, permiten una mejor interpretación de los principales

valores que se derivan del hemograma completo, por lo que no tiene sentido suprimir alguna de las determinaciones ofrecidas por estos equipos.

Wilson D. Manual of laboratory and diagnostic tests. Nueva York: McGraw Hill; 2008. p. 306-310.

BIBLIOGRAFÍA

Bain B, Lewis SM. Basic haematological techniques. En: Lewis SM, Bain B, Bates I. Dacie and Lewis practical haematology. 10 ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2006. p. 26-54.

Bain B. Blood cells: a practical guide. 4 ed. Massachussets: Blackwell; 2006. p. 20-29.

Chaves MA, Sáenz GF, Rodríguez WE. Hemoglobínometría y hematocrito. En: Sáenz GF (editor). Hematología Analítica. 5 ed. San José, Costa Rica: EDNASSS; 2008. p. 559-575.

Gonzales G, Tapia V. Hemoglobina y hematocrito adaptación a la altura: su relación con los cambios hormonales y el periodo de residencia multigeneracional. Rev Fac Med 2007; 15(1): 80-93.

International Committee for Standardization in Hematology: announcement of availability of international hemoglobincyanide reference standard. Br J Hematol 1972; 23:123.

International Committee for Standardization in Hematology: recommendations for haemoglobinometry in human blood. Br J Haemat 1967; 13(Suppl. 71):71.

International Committee for Standardization in Haematology. Recommendations for reference method for haemoglobinometry in human blood (ICSH Standard EP 6/2: 1977) and specifications for international haemoglobincyanide reference preparation (ICSH Standard EP 6/3: 1977). J Clin Pathol 1978; 31(2): 139-143.

Sáenz G, Chaves M, Valenciano E, Montero A, Jiménez J. Hemoglobínometría. Normalización de la metodología. Preparación nacional del estándar de calibración y del hemolizado control. Rev Cost Cienc Med 1984; 5(1): 83-96.

Salas F. Determinación de hematocrito y hemoglobina por "citometría de flujo", como indicadores de anemia en lactantes. "Hospital León Becerra", Guayaquil, 2012. (Tesis). Guayaquil: Universidad de Guayaquil; 2013.

Valenciano E, Schosinsky K, Sáenz GF. Estudio crítico y experimental de la hemoglobínometría. Sangre 1979; 24: 1133-1141.

Villegas A, Álvarez-Salas JL. Método recomendado para la determinación del valor del hematocrito. Sangre 1982; 27(1): 99-104.

Vives JL, Jou JI, Aguilar JL. [Method recommended by the International Committee for Standardization in Hematology for the determination of the hemoglobin concentration of the blood]. Sangre (Barc.) 1981; 26(6): 1172-1178.

LA VELOCIDAD DE SEDIMENTACIÓN ERITROCÍTICA METODOLOGÍA Y SEMIOLOGÍA

*Dr. German F. Sáenz Renauld
Dr. Walter E. Rodríguez Romero
Dr. Walter Cartín Sánchez*

INTRODUCCIÓN

La determinación de la velocidad de sedimentación de los eritrocitos es de extrema utilidad en clínica. Este fenómeno se produce al colocar la sangre anticoagulada en tubos verticales para tal propósito. Si se realiza bajo las estrictas condiciones estipuladas en las técnicas, la eritrosedimentación es indudablemente de gran valor como prueba de escrutinio de enfermedad, así como para seguir su evolución. Con limitadas excepciones, no puede considerarse como curado o sano a cualquier sujeto cuya velocidad de eritrosedimentación (VES) (también llamada velocidad de sedimentación globular -VSG-) denote valores superiores a los normales. Un aumento de esa tendencia de los eritrocitos por sedimentar, se encuentra en muchas condiciones patológicas, sobre todo en desórdenes inflamatorios.

FUNDAMENTO

Los eritrocitos no sedimentan aislados, es decir, individualmente, sino que lo hacen en forma de agregados, de mayor o menor tamaño. Esta agregación fisiológica de los eritrocitos de cualquier sangre en su propio plasma, es por completo distinta de una aglutinación, sea esta dependiente de heteroanticuerpos, isoanticuerpos o autoanticuerpos. En la aglutinación los eritrocitos se unen formando agregados completamente irregulares, uniéndose entre sí de manera arbitraria; por el contrario, en la sedimentación los hematíes se unen cara a cara, como una pila de monedas, formando conglomerados cilíndricos, por lo que se le ha denominado el fenómeno de "formación de rollos" o "pilas de monedas" (rouleaux).

El proceso de sedimentación globular transcurre en forma de una curva de S inversa, constituida por una etapa inicial de descenso muy lento, seguida por una de descenso rápido y finalizando con una de descenso lento. Estas tres etapas de la curva constituyen las tres fases en que transcurre el fenómeno. La primera corresponde a la formación de los agregados (primeros 10 minutos); la segunda (más importante) a la rápida caída de estos (lapso de 40 minutos) y la tercera, a la de empaquetamiento de todos ellos en el fondo del tubo.

POTENCIAL ZETA

Los eritrocitos sedimentan porque su densidad es mayor que la del plasma. El descenso de los glóbulos rojos causa desplazamiento del plasma hacia arriba, lo cual produce una corriente ascendente y una fuerza de retraso. En la sangre normal, las fuerzas ascendente y descendente son casi iguales y hay poca sedimentación. El volumen de la partícula (rouleaux) que sedimenta es uno de los principales factores que afectan la VES en estado patológico.

Cuando se aglomeran los eritrocitos, el aumento de peso de la masa tiene mayor efecto en el incremento de la velocidad de sedimentación, que el aumento de volumen para retrasarla. En consecuencia, cualquier estado que cause pilas de monedas, incrementará la velocidad de sedimentación. En presencia de ciertas condiciones se acelera la agregación de los glóbulos rojos; esto produce agregados corpusculares de gran volumen, pero de área relativamente pequeña. Este fenómeno es la causa principal de la aceleración de la sedimentación que se presenta en la enfermedad crónica o el embarazo.

La razón del aumento en la agregación no está muy clara; sin embargo, es probable que se produzca como respuesta a los cambios en la carga negativa (**potencial zeta**) de los eritrocitos. Dicha carga deriva sobre todo del ácido n-acetilneuramínico (ácido siálico), y es igual en todos los eritrocitos normales. Debido a que las cargas iguales se repelen, los glóbulos rojos normalmente están separados unos de otros; no obstante, esa carga negativa puede ser disminuida por el efecto dieléctrico de proteínas presentes en el plasma, en especial por macromoléculas asimétricas, como el fibrinógeno y la gammaglobulina. De tal forma, las variaciones en la tasa de sedimentación reflejan por lo general alteraciones de esas proteínas plasmáticas, las cuales tienen un mayor efecto -en relación con otras proteínas- para disminuir la carga negativa de los eritrocitos (el potencial zeta), que los tiende a mantener separados por repulsión eléctrica.

La disminución del potencial zeta promoverá la formación de rouleaux y, por ende, un aumento de la VES.

Si se remueve el fibrinógeno por desfibrinación, la VES alta se revierte a normal o baja ostensiblemente, excepto cuando otras inmunoglobulinas están en concentración superior al fibrinógeno este procedimiento no originará cambios importantes en la VES, por lo que continuará aumentada.

La intensidad de la VES está casi determinada de manera exclusiva por factores plasmáticos que condicionan la extensión del rouleaux: altas concentraciones de fibrinógeno y de otras proteínas de fase aguda (haptoglobinas, ceruloplasmina, alfa-1-antitripsina, alfa-1-glicoproteína ácida, proteína C reactiva), así como inmunoglobulinas, sean monoclonales o no.

Las proteínas de fase aguda (incluido el fibrinógeno) son sintetizadas en cantidades incrementadas como respuesta o reacción a:

1. Daño tisular agudo causado por factores físicos, toxinas, trauma, infección, infartación o proceso inmunológico.
2. Enfermedad crónica: inflamación, infección y enfermedades de colágeno.
3. Enfermedad maligna.
4. Embarazo y puerperio.

Además del papel de las proteínas de fase aguda en la aceleración de la VES, se pueden mencionar los factores celulares. En este sentido, se observa que la anemia es responsable de una VES acelerada, debido a que el cambio en la relación eritrocitos-plasma favorece la formación de rouleaux. Estos cambios son independientes de los que se presentan en la concentración de proteínas plasmáticas. Los glóbulos rojos microcíticos sedimentan mucho más lentamente que los macrocitos, los cuales, por su parte, sedimentan algo más rápido que los normocitos. Es importante tener presente que cuando más grande es la célula, más pequeña la superficie en relación con el volumen.

Si los eritrocitos tienen una forma anormal o irregular, no logran hacer rouleaux, por lo que presentan una VES baja: una extrema poiquilocitosis, la anemia drepanocítica y cuadros de esferocitosis, son ejemplos de ello.

METODOLOGÍA PARA MEDIR LA VES

Son dos los métodos que suelen ser utilizados para medir la VES: el de Wintrobe y el de Westergren. Ambos tienen sus limitaciones. El de Westergren es menos sensible para pequeños cambios de los factores que promueven la VES, por lo que puede ser menos adecuado para escrutinio de salud. El método de Wintrobe, por otro lado, en ocasiones da un valor

falsamente bajo, cuando en el de Westergren se halla marcadamente elevado. Para este último, una VES máxima se define como aquella que es restringida por el Hto, que es de 120 mm/h, toda vez que los valores que exceden esa caída se deben a un hematocrito bajo, más que a una influencia exagerada de un factor intensificador de la VES.

Ambos métodos citados son altamente sensibles a la relación plasma-eritrocitos, por lo que ante anemia se produce un incremento inespecífico de la VES. Esto se debe a que se acelera la agregación de células y hay una reducción de la fuerza friccional entre los agregados que van sedimentando, tal y como se explicó en el apartado anterior.

Se han hecho intentos con el fin de aplicar factores de corrección para anemia, pero todos son desconfiables, ya que la influencia de la anemia sobre la VES difiere de manera evidente entre los individuos, probablemente en vista de diferentes patrones de proteínas.

El Comité Internacional para la Estandarización en Hematología (ICSH de la ISH) ha recomendado el de Westergren, por ser más confiable y más reproducible, a pesar de sus deficiencias inherentes.

Además de estos métodos, en la actualidad existen muchos sistemas automatizados para determinar la VES, los cuales expresan sus resultados en mm/h, en un plazo de 20 o 30 minutos. Estos equipos permiten mantener una temperatura constante (18 Celsius) durante el tiempo de la determinación, eliminando así un sesgo importante. Cabe destacar que los sistemas que utilizan métodos automatizados basados en Westergren tienden a subestimar las lecturas normales de la VES, lo que se confirma cuando se realiza el análisis estadístico de Bland-Altman, razón por la cual el resultado debe ser corregido utilizando factores de corrección.

Hay otros sistemas automatizados que utilizan métodos alternativos al Westergren. Las segundas generaciones de estos instrumentos utilizan volúmenes muy pequeños de muestras (25 µl), lo que lo hace sumamente versátil para trabajar con pacientes pediátricos. Estos equipos centrifugan la muestra a 1.500–2.000 rpm por un periodo de tiempo corto (tres minutos), mientras que un rayo láser realiza múltiples mediciones en la interfase eritrocito-plasma, en la cual identifica una porción lineal de la curva de sedimentación y mediante el uso de un algoritmo determina la VES (mm/h). Las compañías reportan un 0,96% de correlación con el método de Westergren.

Método de Wintrobe

- Se toman 5 ml de sangre venosa y se mezclan con 7,5 mg de EDTA_2Na o 3-4 potásico.
- Se llena un tubo de hematocrito de Wintrobe hasta la señal 100 mm. El tubo se debe mantener en posición perfectamente vertical durante la sedimentación de los eritrocitos y la temperatura de la habitación no debe ser menor a 22 °C, ni mayor a 25 °C (en el primer caso se retarda y en el segundo se acelera).
- A la hora exacta, se lee la distancia hasta la que han caído los eritrocitos. Los milímetros leídos corresponden a la VES/h.

Velocidad de sedimentación corregida

En vista de que los volúmenes relativos del plasma y de los eritrocitos influyen sobre la eritrosedimentación,

se han propuesto varios métodos para corregir los resultados en las anemias.

En primer lugar, se practica la velocidad de sedimentación, para lo cual se utiliza el tubo hematocrito especial de Wintrobe; luego, con el mismo tubo se determina, por centrifugación, el índice hematocrito.

La velocidad de sedimentación se corrige después, de acuerdo con el volumen de eritrocitos (Hto), gracias al uso de la gráfica de corrección del tiempo de sedimentación (Figura N° 1). En esta se halla primero la línea vertical, que corresponde a los milímetros de sedimentación en una hora; luego se sigue esa línea hasta que corte la horizontal, que representa el valor hematocrito; posteriormente, se sigue la curva más próxima hasta su intersección con la línea oscura 42 para mujeres o 47 para varones. Este punto de cruce indica la velocidad de sedimentación corregida, si se lee por la línea vertical.

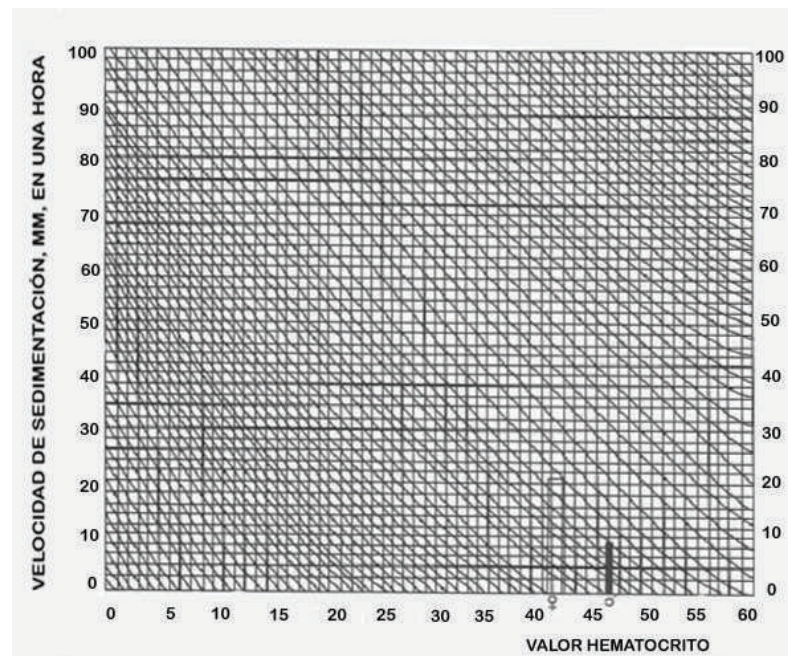


Figura N° 1. Tabla para la corrección de la velocidad de sedimentación eritrocítica de acuerdo con el valor hematocrito.

Método de Westergren

Anticoagulante:

citrato trisódico dihidratado ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$): 109 mmol/L, solución acuosa (32,08 g/L).

- Se ponen exactamente 0,5 ml de solución filtrada de citrato sódico en un tubo aforado a 2,5 ml.
- Se extraen 5 ml de sangre venosa y se trasladan 2 ml al tubo que contienen el anticoagulante. El

tubo se invierte tres a cinco veces para mezclar correctamente la sangre con la solución citratada.

- Se llena el tubo de Westergren (pipeta de 300 μl , 1,5 mm de largo, con una calibración de 0 a 200 mm), exactamente hasta la señal 0 y se coloca en el soporte. Antes de aflojar la presión del dedo que tapa el extremo superior del tubo, se debe asegurar que su extremo inferior quede bien apretado contra el tapón de goma colocado en la base del soporte. El tubo debe quedar firmemente sujeto

por el prendedor que recibe su extremo superior y bien colocado en posición vertical. A la hora exacta, se lee la distancia hasta la que han caído los eritrocitos. Los milímetros leídos corresponden a la VES/h. En la actualidad se venden tubos descartables para este fin, tanto de Westergren como de Wintrobe.

Modificación al método de Westergren

Se utiliza sangre anticoagulante con sales EDTA, aspecto que hace más conveniente y práctico el trabajo diario. Luego, se diluyen 2 ml de sangre EDTA, debidamente homogeneizados, con 0,5 ml de la solución de

citrato o de NaCl al 0,85%. De esta forma se obtiene el mismo grado de dilución que preconiza el método clásico.

Para cualquiera de los métodos citados, la sangre anticoagulada con EDTA puede mantenerse por 12 h a 4 °C, sin que se afecte la VES.

VALORES NORMALES DE LA VSG

En el Cuadro N° 1 se detallan los valores normales (o de referencia) de la velocidad de sedimentación globular (VSG) (sinónimo de VES), considerando que esta varía con la edad y el sexo de la persona.

Cuadro N° 1. Valores normales de la VSG		
	Valor	Método
Hombres	<15 mm/h	Bajo los 50 años de edad (Westergren)
Mujeres	< 20 mm/h	
Niños	< 15 mm/h	
Hombres	< 20 mm/h	Sobre los 50 años de edad (Westergren)
Mujeres	< 30 mm/h	
Hombres	Hasta 7 mm/h	Método de Wintrobe
Mujeres	Hasta 15 mm/h	
Niños	Hasta 20 mm/h	
Recién nacidos	0-2 mm/h	

Semiología

Se subdividen arbitrariamente los valores patológicos de la velocidad de sedimentación en cuatro grandes grupos (varones; método de Wintrobe):

- Ligeramente acelerada: hasta 15 mm (la hora).
- Acelerada: 15-25 mm (la hora).
- Muy acelerada: 25-40 mm (la hora).
- Intensamente acelerada: más de 40 mm (la hora).

En la valoración clínica de las cifras patológicas de la velocidad de sedimentación, se deben tener presente varios aspectos; por ejemplo, la falta absoluta de especificidad de la VES y el hecho de que esta se acelera de manera general en todos los procesos inflamatorios, sean infecciosos o no, y en los que se presenta destrucción tisular. En estos procesos se aumentan también, además del fibrinógeno, otras proteínas de fase aguda, como la proteína C reactiva (PCR). De ahí que, como índice fiel de aquellos procesos, sirve como guía utilísima de su actividad y por ende, para

seguir el curso evolutivo de las enfermedades de ese tipo (tuberculosis, fiebre reumática, artritis crónica, entre otras). Aunque la leucocitosis y el aumento de la velocidad de la sedimentación tengan cierta relación, en cuanto a sus factores determinantes, no siguen un paralelismo estricto.

COMENTARIOS FINALES

1. La VES es mayor en hombres que en mujeres y se incrementa de forma gradual con la edad.
2. En algunos países, la VES puede ser mayor a los valores normales citados -en individuos libres de síntomas-, presumiblemente debido a la alta concentración de inmunoglobulinas.
3. El factor clave en la estimulación de la VES es el fibrinógeno. En segundo término, otras proteínas de fase aguda y los incrementos de anticuerpos policlonales o la presencia de paraproteínas monoclonales. Estos factores pueden por sí solos alterar la VES, aunque son frecuentes las asociaciones (por ejemplo, una albúmina baja).

4. A una VES constante, la contribución relativa de las proteínas plasmáticas a ella es: fibrinógeno 10, alfa globulinas 5, gammaglobulinas 2 y albúmina 1.
5. Las cadenas livianas no interfieren con la VES, tal vez por su bajo peso molecular y su baja concentración en el plasma.
6. La VES es especialmente baja en policitemia, anormalidades eritrocíticas (esferocitosis, síndromes drepanocíticos, poiquilocitosis intensa, etc.), hipofibrinogenemia y fallo cardíaco congestivo.
7. La hemólisis modifica la VES, al igual que el tipo de anticoagulante; los mejores son K3, K4- EDTA (1,7 mg/m de sangre).
8. La limpieza de los tubos es muy importante, por lo que toda traza de alcohol o de éter debe ser removida.
9. La inclinación de los tubos acelera la VES: los eritrocitos se agregan a lo largo del lado bajo o inferior del tubo, mientras que el plasma se acumula superiormente. Por lo tanto, la influencia retardadora del plasma sobrenadante será menos eficaz. Un ángulo de tres grados respecto de la correcta posición vertical, puede acelerar la VES tanto como un 30%.
10. La presencia de burbujas de aire en el tubo afecta la VES.
11. La temperatura ambiental debe encontrarse en el rango de 22-27 °C. Cualquier desviación de este ámbito puede alterar los resultados.
12. Si la sangre ha estado bajo refrigeración, debe permitírsele tomar la temperatura ambiental, antes de montar la prueba.
13. Si no se ha guardado la sangre (no más allá de 12 horas) a 4 °C, se obtendrán valores falsamente bajos en muestras con elevada VES. Eso se podría explicar por la tendencia de los eritrocitos a hacerse esféricos y menos aptos, por consiguiente, para organizarse en rouleaux.
14. La anemia acelera la VES y este cambio es independiente de los cambios en las proteínas plasmáticas. Solo con el método de Wintrobe se puede hacer la corrección con respecto a anemia. Para algunos autores es una operación cuestionable. La sensibilidad de la VES en la detección de anormalidades proteicas es ideal en ausencia de anemia.
15. Dentro de los factores que tienden a disminuir la VES se encuentran: desfibrinación, coagulación parcial, baja temperatura, exceso de anticoagulante y un diámetro del tubo (Westergren) de menos de 2 mm.
16. La heparina no debe usarse, ya que altera el potencial zeta de la membrana eritrocítica. Sin embargo, es el anticoagulante que se preconiza en el micrométodo.
17. En el embarazo se aumenta moderadamente la VES; su elevación comienza en las 10-12 semanas y se normaliza al mes luego del parto.
18. La VES tiende a ser marcadamente elevada en los desórdenes proteicos de carácter monoclonal (mieloma múltiple, macroglobulinemia, etc.), en las hiperglobulinemias policlonales severas debidas a enfermedad inflamatoria y en la hiperfibrinogenemia. Dentro de estos desórdenes se incluyen: artritis reumatoide, infecciones crónicas, enfermedades de la colágena y en trastornos neoplásicos, en donde constituye un indicador sensible de la presencia de enfermedad activa de esas patologías.
19. Una VES normal en presencia de una enfermedad clínica abierta o florida, puede ocurrir por una síntesis anormal de proteína o por pérdida, tal y como puede suceder en la hipogammaglobulinemia, en el linfoma o en la enteropatía con pérdida de proteínas.
20. Una VES examinada en el acmé de una enfermedad, no adquiere toda su significación hasta que se compara con determinaciones ulteriores. En una enfermedad aguda no interesa medir la VES si solo puede evaluarse esperando a que vuelva a su normalidad (nótese la analogía con la forma de temperatura en caso de fiebre).
21. Los datos secundarios de una medición de la VES, como el aspecto del plasma en el tubo de sedimentación o la presencia de agregados celulares patológicos (en las leucemias, por ejemplo), en ocasiones permiten sacar conclusiones interesantes. El plasma es amarillo dorado en hemólisis, muy claro en la anemia ferropriva, amarillo pajizo en la anemia perniciosa, turbio en la nefrosis, la diabetes y en hiperlipemias hipertrigliceridémicas, así como después de ingerir grasas.
22. Patológicamente, la VES está incrementada en la inflamación activa, infecciones, toxemias, insuficiencia renal, destrucción celular o tisular, anemia severa, tuberculosis activa y sífilis, trombosis coronaria aguda, artritis reumatoide, polimialgia reumática, artritis gotosa aguda, hemopatías malignas (linfomas) y gammapatías monoclonales (discrasias de células plasmáticas). También está acelerada en todas las enfermedades del colágeno, excepto en el escleroderma difuso. Puede estar ligeramente incrementada en la osteoartritis. Se encuentra dentro de límites normales en reumatismo no articular (neuritis, miositis, fibrocitis, lumbago, etc.).
23. En enfermedad aguda el cambio de la VES puede estar atrasado con respecto a la temperatura y la leucocitosis en un lapso de 6-24 horas; alcanza su máximo de positividad después de varios días. En la convalecencia, el índice de la VES tiende a

persistir más allá de la temperatura y de la leucocitosis.

24. Algunos medicamentos alteran los VES; tal es el caso del prozac, los antiinflamatorios no esteroideos y la cortisona.
25. En el dengue se han descrito niveles de VSG comparativamente normales. En estudios realizados en niños hospitalizados por dengue hemorrágico se observó un valor promedio bastante menor que en pacientes con otras infecciones virales y bacterianas.

BIBLIOGRAFÍA

Cornejo M. Velocidad de sedimentación en niños normales, distróficos y toxicósicos. (Versión en Internet). Revista Peruana de Pediatría; S.F. Consultado en: <http://www.bvsde.paho.org/texcom/revperupediatr/mcornejo.pdf>

Dacie JV, Lewis SM. Practical hematology. 5 ed. London: Churchill Livingstone; 1975.

Nelson DA. Hematology and coagulation. Basic methodology. En: Henry JB. Clinical diagnosis and management by laboratory methods. 16 ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co.; 1979. p. 859-917.

Sáenz GF, Alvarado MA, Atmetlla F, Arroyo G, Valenciano E, Schosinsky K. Hematología teórico-práctica. 7 ed. San José, Costa Rica: Editorial Universidad de Costa Rica; 1981.

Salazar L. Velocidad de sedimentación globular: de vuelta Westergreen. Rev Med Costa Rica Centroam 2000; 67(552): 117-122.

Villar LA, Díaz FA, Martínez RA. Utilidad de la velocidad de sedimentación globular en el diagnóstico temprano del dengue en un área endémica. Infectio 2007; 11(4): 151-158.

CITOMORFOLOGÍA, NOMENCLATURA Y ANÁLISIS DEL FROTIS SANGUÍNEO Y DE MÉDULA ÓSEA

Dr. German F. Sáenz Renauld
Dr. Walter Cartín Sánchez
Dra. Sandra Boza Oreamuno
Dr. Luis Mora Bermúdez

INTRODUCCIÓN

En el presente capítulo se describen las principales características morfológicas que le permiten al observador su identificación; esto con el fin de definir el proceso de maduración de las diferentes líneas celulares.

CITOMORFOLOGÍA DE LA SERIE LEUCOCÍTICA NORMAL

Linfoblastos

Son las células más inmaduras de la serie linfoide. Son frecuentes en la leucemia linfoblástica aguda (LLA), aunque se pueden ver en las crisis blásticas de las leucemias mieloides crónicas (LMC) y en otros desórdenes mieloproliferativos.

Utilizando marcadores celulares de superficie, la LLA puede dividirse en linaje B, linaje T e indiferenciada. Tanto la de linaje B como la T pueden subdividirse según el patrón de marcadores de superficie celular.

Morfológicamente y de acuerdo con los criterios del grupo cooperativo FAB (*French-American-British*), los linfoblastos se clasifican en tres subtipos: L1, L2 y L3.

Blasto tipo L1

Se caracteriza por una población homogénea de linfoblastos. Son blastos relativamente pequeños, que miden entre 10 y 20 μm , con núcleo regular redondo, aunque algunos son de forma oval. El contorno nuclear es liso, pero pueden observarse indentaciones. La cromatina es homogénea y fina, más gruesa y compacta que otro tipo de blastos. El nucleolo por lo general es uno solo y pequeño, inconspicuo por el patrón denso de la cromatina.

Blasto tipo L2

Exhiben una marcada heterogeneidad en el tamaño, con un predominio de blastos grandes. El núcleo es variable, desde redondo u oval hasta irregular y con indentaciones. Tienen semblanza monocitoide y pueden

confundirse con monoblastos, y si el núcleo es regular hasta con mieloblastos. La cromatina es variable aun en un mismo paciente. Se pueden observar vacuolas, pero no son prominentes.

Blasto tipo L3

Se observan en la LLA-L3 y exhiben características que los hacen únicos. Son grandes y uniformes en tamaño y forma. El núcleo es redondo u oval con un contorno liso. La mayoría posee uno o más nucléolos prominentes y tienen una cantidad moderada de citoplasma basófilo que contiene vacuolas redondas de tamaño similar, que rodean el núcleo; algunas pueden observarse incluso sobre el núcleo.

Debido a que los linfoblastos son muy variables en su apariencia, se hace difícil clasificarlos de manera correcta basándose solo en la morfología, ya que pueden confundirse con mieloblastos, monoblastos, megacarioblastos, células de linfomas y linfocitos estimulados. Para llegar a un diagnóstico definitivo es necesario hacer citoquímica o usar marcadores de superficie. Si no existe información adicional confirmatoria, estas células se deben describir como blastos y no tratar de clasificarlas.

Prolinfocitos

Normalmente no se ven en sangre periférica ni en médula ósea. Se observan en casos de leucemia linfocítica crónica (LLC), donde están presentes en cantidades menores al 10%, en la transformación prolinfocítica de la LLC y en la leucemia prolinfocítica (LPL).

Su tamaño varía entre los 10 y 18 μm . Son más grandes que los linfocitos normales y de tamaño similar a los linfoblastos. El núcleo es central, redondo u oval, con moderado citoplasma basófilo. El citoplasma es más abundante que el de los linfocitos normales o blastos y puede contener escasos y pequeños gránulos azurófilos. La cromatina es más condensada que en los linfoblastos y más abierta que en los linfocitos maduros; tienen un solo nucleolo prominente.

Linfocitos

Son constituyentes normales de sangre periférica y de médula ósea. La mayoría de los linfocitos de sangre periférica son homogéneos, pequeños, con núcleo redondo que puede presentar indentaciones. El tamaño varía de 7 a 15 μm . La cromatina es densa y puede presentarse agrupada. Los nucléolos no son visibles. La mayoría tiene citoplasma escaso, moderadamente basófilo y agranular. Los que poseen un citoplasma abundante, por lo general tienen gránulos azurófilos distribuidos de manera heterogénea. Esos linfocitos se observan en individuos normales o aumentados en asocio a linfocitos reactivos. Los marcadores de membrana de los linfocitos grandes demuestran linfocitos *natural killer* o citotóxicos/supresores CD8 positivos.

Monoblastos

Comparten con las células mieloides un precursor común: la UFC-GM, que es la primera célula comprometida de la serie monocítica, a partir de la cual se generan el monoblasto, el promonoblasto y el monocito.

Entre el monoblasto y el monocito, ocurren de tres a cuatro divisiones celulares. Una vez maduro, el monocito sale de la médula ósea y entra al torrente sanguíneo, donde permanece entre 12 y 24 horas antes de ingresar a los tejidos. Aquí se transforma en macrófago y puede sobrevivir por largos periodos.

Los monocitos inmaduros se observan aumentados en las malignidades que involucran la línea monocitoide. Sus características morfológicas son similares a los otros blastos, su citoplasma es abundante y el núcleo más irregular que los mieloblastos. Las tinciones citológicas (especialmente la tinción de esterasas no específicas) o los marcadores de superficie ayudan a establecer el linaje de las células monocitoides.

Cabe destacar que desde el punto de vista morfológico resulta difícil distinguir entre el monoblasto y el mieloblasto.

Promonocitos

Son células de núcleo irregular, con la cromatina más fina que los monoblastos y presentan nucléolos o restos de ellos. Su morfología es intermedia entre el monoblasto y el monocito. Pueden presentar finos gránulos azurófilos y basofilia tenue.

Monocitos

Los monocitos maduros son más grandes que los neutrófilos, y miden entre 12 y 20 μm . La mayoría

tienen bordes lisos y redondos, pero en algunos se observan extensiones que semejan pseudópodos. El núcleo, situado en posición central, está indentado e inclusive puede parecer una banda. La cromatina es menos densa que la del neutrófilo o la del linfocito. No se observan nucléolos, el citoplasma es abundante de color grisáceo o azul grisáceo (con apariencia de vidrio pulido) y puede contener gránulos rosados azurófilos y vacuolas o material fagocitado.

Mieloblastos

Son las células más inmaduras de la serie mieloide. Están confinadas a la médula ósea, donde constituyen menos del 3% de las células nucleadas. Se observan en circulación en las leucemias agudas no linfoides y en los desórdenes mieloproliferativos y mielodisplásicos. Es una célula grande de 15 a 20 μm de diámetro. El núcleo tiene cromatina fina reticulada y se pueden observar nucléolos. Generalmente, es redondo y en situaciones patológicas se perciben indentaciones. El citoplasma es basófilo y agranular. En las leucemias se pueden ver mieloblastos pequeños (micromieloblastos); además, en este padecimiento se pueden encontrar tres tipos distintos de mieloblastos: el tipo I es idéntico al descrito, sin gránulos en el citoplasma; el tipo II posee un citoplasma con escasos gránulos o cuerpos de Auer; y el tipo III contiene numerosos gránulos azurófilos.

En ausencia de cuerpos de Auer, de gránulos característicos en el citoplasma, de información citoquímica y de marcadores de membrana (inmunofenotipo), no es posible definir el linaje de una célula con características de blasto.

Promielocitos

Son de forma redonda u oval, levemente más grande que el mieloblasto. Una célula es promielocito cuando presenta gránulos primarios azurófilos en su citoplasma. Estos gránulos son gruesos y azurofílicos y pueden situarse encima del núcleo. Los promielocitos poseen una alta relación núcleo/citoplasma, una cromatina fina y en estos se pueden observar nucléolos. Normalmente, están confinados a la médula ósea, donde comprenden menos del 2% de las células nucleadas. En estadios patológicos se pueden ver promielocitos hipogranulares o microgranulares.

Mielocitos

La transición de promielocito a mielocito ocurre cuando se terminan de producir los gránulos primarios (azurófilos) y se inicia la producción de gránulos secundarios o específicos (de color lila). Los mielocitos constituyen

aproximadamente el 10% de las células nucleadas en una médula ósea normal. El núcleo es más excéntrico, carece de nucleolo y empieza a evidenciar aglomeración más compacta de la cromatina. El citoplasma es más abundante que en los estadios anteriores y es anfofílico. Se pueden observar al mismo tiempo gránulos primarios y secundarios, con predominio de los específicos conforme las células van madurando.

Metamielocitos

Los metamielocitos son las primeras células de los precursores postmitóticos. Son más pequeños que los mielocitos y constituyen del 15% al 20% de las células nucleadas de la médula ósea normal. La cromatina nuclear está en grumos y el núcleo se encuentra indentado en menos de la mitad del diámetro de este. El citoplasma es abundante con predominio de gránulos específicos (de color lila) y muy pocos gránulos primarios (azurófilos).

Células en banda

Constituyen del 10% al 15% de las células nucleadas en la médula ósea normal y hasta un 3% en sangre periférica. La cromatina del núcleo está agregada y el núcleo se encuentra en más de la mitad de su diámetro. El núcleo puede asumir forma de U, de S y de C, y puede estar doblado sobre sí mismo. La célula en banda no presenta un núcleo segmentado; es decir, no media hilo de cromatina entre los lóbulos.

Segmentado

El segmentado neutrófilo es la célula más abundante y madura de la serie mieloide. Tiene las mismas características de las células en banda en cuanto a tamaño, cantidad de citoplasma y granulación; sin embargo, su núcleo es segmentado o lobulado (normalmente de dos a cinco lóbulos, los cuales están conectados por un hilo de cromatina). El filamento se observa con una línea oscura, semejante a un cordón sólido, tan delgado que dentro no se observa cromatina. La cromatina está agrumada y no se observan estructuras en esta. La relación núcleo/citoplasma se encuentra a favor del citoplasma (N:C = 1:3).

Plasmablastos

Las células B pasan por tres estadios de maduración bien definidos. Las células plasmáticas o plasmocitos constituyen la forma más madura; el proplasmocito representa la etapa intermedia de madurez, y el inmunoblasto o plasmablasto la forma más inmadura. En el caso de este último, su tamaño varía entre 25 y 40 μm , con un citoplasma de leve a moderadamente

basófilo, sin arcoplasma, con un núcleo excéntrico, de forma redonda u oval, con cromatina fina y con la presencia de hasta seis nucléolos.

Proplasmocito

Como se mencionó, el proplasmocito es la célula intermedia entre el plasmablasto y el plasmocito. Su tamaño varía entre 15 y 30 μm , observándose en su citoplasma una basofilia que varía entre moderada e intensa, y se puede apreciar levemente el arcoplasma. El núcleo es excéntrico, de forma redonda u oval, con una membrana nuclear más gruesa y con la cromatina en grumos. Los nucléolos son escasos (entre uno y dos) y parcialmente enmascarados por la cromatina. En ocasiones se pueden observar en el citoplasma pequeñas vacuolas y algunas veces inclusiones por inmunoglobulinas (cuerpos de Russell). A la célula que tiene múltiples cuerpos de Russell se le conoce como célula de Mott.

Célula plasmática

Las células plasmáticas son linfocitos B maduros, y normalmente producen y secretan inmunoglobulinas. Su tamaño varía entre 7 y 25 μm . Presenta un citoplasma muy basófilo y un arcoplasma característico. El núcleo es excéntrico, redondo y con membrana nuclear gruesa. No se observan nucléolos.

Las células plasmáticas son constituyentes normales de la médula ósea, ganglios linfáticos, tracto gastrointestinal y tejido conectivo. Rara vez se observan en sangre periférica. Un aumento en su número, ya sea en sangre o médula ósea, está asociado con desórdenes crónicos o inflamatorios que terminan en un incremento de la producción de anticuerpos.

Megacarioblasto

El megacarioblasto mononuclear tiene un tamaño aproximado de 15 μm . Su núcleo es grande, redondo o levemente indentado, con cromatina homogénea y fina, rodeado de un delgado anillo basofílico y suele presentar nucléolos visibles.

En general, el megacarioblasto es una célula de observación infrecuente en la médula ósea.

Promegacariocito

También conocido como el megacariocito basófilo. Tiene un tamaño aproximado de 20 μm ; su núcleo se encuentra lobulado o en forma de herradura y no posee nucléolos. La cromatina empieza a agrumarse, la intensidad de la basofilia en el citoplasma aumenta y

puede comenzar a mostrar gemaciones del citoplasma. Cerca del núcleo empiezan a formarse las primeras plaquetas y gránulos azurófilos. En este estadio finaliza la duplicación del ADN.

Megacariocitos

Son las células más grandes de la médula ósea (miden entre 25 y 50 μm) y se desarrollan a través de un proceso muy complejo que incluye proliferación de las células madre, duplicación del núcleo sin división celular y maduración. La etapa final es la fragmentación del citoplasma con la liberación de las plaquetas al torrente sanguíneo. Esta secuencia de eventos es única, porque involucra la endoreplicación, un proceso conocido como endomitosis, en el cual hay duplicación de los cromosomas, pero no hay división celular. El tiempo que transcurre entre la maduración del megacarioblasto y la liberación de las plaquetas es de cinco días.

Los megacariocitos son células muy pleomórficas, cuyo núcleo presenta gran cantidad de lóbulos de diversos tamaños, unidos por bandas o hilos de cromatina. La cromatina al inicio es gruesa y agrumada, y luego se vuelve picnótica en las células más maduras. El citoplasma es abundante y se tiñe de color rojo vino. Posee gránulos azurófilos, los cuales pueden observarse en grupos, debido a la formación de líneas de demarcación del citoplasma, que son las que al final liberan las plaquetas a la circulación.

Se encuentran aumentados en síndromes mielodisplásicos, desórdenes mieloproliferativos crónicos, leucemia megacarioblástica aguda (M7), PTI, hiperesplenismo, infecciones, pérdida de sangre y en algunas otras neoplasias. Por el contrario, se encuentran disminuidos en leucemias agudas, infiltraciones de la médula ósea por células neoplásicas (histiocitosis, linfoma, carcinoma, etc.), infecciones virales, anemia aplásica y en pacientes con tratamiento con radiación o drogas tóxicas.

Plaqueta

Se denomina así a cualquier célula de la serie trombocítica que no contenga núcleo. Es decir, cualquier fragmento no nucleado del citoplasma megacariocítico que contenga gránulos azurófilos similares a los del megacariocito maduro.

Las plaquetas tienen un diámetro de 1 a 4 μm y aparecen con un centro granuloso (azurófilo). Se consideran plaquetas grandes las que miden entre 4 y 7 μm , y gigantes las que miden entre 10 y 20 μm .

Su forma es variable, aunque por lo general son redondas u ovales. Normalmente se pueden observar entre 8-15 plaquetas por campo de inmersión de 100x o alrededor de una plaqueta por cada 10 o 20 glóbulos rojos.

La mayoría de las plaquetas circulan entre 7 y 10 días, después de los cuales son removidas por el bazo.

Eosinófilo

Los eosinófilos maduros se caracterizan por gránulos esféricos relativamente grandes, los cuales tienen gran afinidad por la eosina. Por lo general, no se observan sobre el núcleo. El intenso color eosinofílico característico, hace que estas células sean fácilmente reconocibles en el frotis sanguíneo. Sin embargo, la decoloración puede darle a estos gránulos un tinte azulado, café o incluso rosado. Están presentes en sangre periférica, médula ósea y tejidos. Como la proporción de eosinófilos es baja en sangre periférica, no ofrece utilidad clínica separar los eosinófilos en categorías (mielocitos, metamielocitos, banda, segmentados).

Los eosinófilos tienen el mismo tamaño de los segmentados neutrófilos (10-15 μm). El 80% presentan un núcleo bilobulado, con ambos lóbulos de forma redonda u oval y de igual tamaño.

Basófilo

En tamaño, forma y morfología nuclear, el basófilo es idéntico al eosinófilo o al neutrófilo. El basófilo se caracteriza por la presencia de gránulos metacromáticos característicos de diferente tamaño y que se ubican al lado, debajo y por encima del núcleo. El color predominante es azul-negro, aunque algunos se pueden teñir de una tonalidad que varía de púrpura a rojiza. Se encuentran en muy bajo número en la sangre y son las células menos abundantes (0-1%).

Los basófilos permanecen en la sangre solo unas horas, después se desplazan hacia los tejidos, donde su destino es incierto.

CITOMORFOLOGÍA DE LA SERIE ERITROCÍTICA NORMAL

Proeritroblastos

Son las células más inmaduras de la serie roja y normalmente están confinadas a la médula ósea, donde representan menos de un 3% de los eritroblastos. En la leucemia eritroide aguda (M6), rara vez se observan en sangre periférica. El tamaño varía de 17 a 24 μm de

diámetro. El núcleo ocupa alrededor del 80% de la célula y es redondo o ligeramente oval; en él se pueden observar uno o más nucléolos. La cromatina es fina y conforme madura se va volviendo más gruesa. El citoplasma es levemente basófilo y no contiene gránulos. En estados patológicos puede tener formas nucleares displásicas, megaloblásticas y hasta lobuladas.

Eritroblasto basófilo

Estos eritroblastos son más pequeños que los proeritroblastos (miden entre 10 y 17 μm), pero son similares en su forma, aunque con más citoplasma basófilo de apariencia azul royal. Normalmente comprenden un 6,8% de las células en médula ósea. Conforme la célula madura, la cromatina se vuelve gruesa y no se observan los nucléolos. Por el aumento en la hemoglobina, el citoplasma empieza a adquirir un color azul-grisáceo.

Eritroblasto policromatófilo

Son células redondas u ovoides, pero más pequeñas que sus predecesores, midiendo entre 10 y 15 μm . Su núcleo es redondo y puede estar localizado de manera central o excéntrico. El citoplasma es abundante y en sus formas más inmaduras es de color azul-grisáceo, mientras que en las formas tardías es de color gris-rosáceo; esto dependerá no solo de la cantidad de hemoglobina presente, sino también de la cantidad de ARN. Esta es la última célula de serie roja capaz de dividirse.

Eritroblasto ortocromático

Son más pequeños, miden entre 8-12 μm . El núcleo es más pequeño y picnótico. Por lo general, está localizado de manera excéntrica y en algunos casos puede estar extruido o fragmentado. El citoplasma se encuentra en mayor cantidad y usualmente se tiñe de color naranja-rosado con una basofilia muy leve. La relación núcleo-citoplasma es 1:2. En conjunto con los eritroblastos policromatófilos, representan el 90% de las células rojas nucleadas en médula ósea.

Los eritroblastos ortocromáticos son la última etapa de maduración de las células rojas nucleadas y ya no pueden dividirse. Luego de que el núcleo es extraído, la célula se vuelve reticulocito.

Reticulocitos

El estadio de los reticulocitos inicia cuando el núcleo es extruido y termina con la pérdida de las organelas citoplasmáticas. Conforme las mitocondrias son desmanteladas y los ribosomas son degradados, la célula

asume la forma bicóncava y circula como un eritrocito maduro. Los reticulocitos maduran en la médula ósea por 48 horas y luego otro día más en la circulación. Con la tinción de Wright-Giemsa adquieren un color azul-pálido (policromasia). Generalmente, son mejor reconocidos cuando se utilizan tinciones supravitales (para células vivas no fijadas), como el nuevo azul de metileno o el azul cresil brillante, los cuales tiñen el ARN remanente, al aparato de Golgi y las mitocondrias en el citoplasma. Con esta tinción las organelas se aglutinan en forma de malla (reticulina). Los reticulocitos más jóvenes tienen más sustancia reticulofilamentosa que los maduros. Normalmente, representan menos del 1,5% de los eritrocitos circulantes.

Eritrocitos

Son células anucleadas, circulares bicóncavas, que circulan en la sangre. Tienen un tamaño promedio de 7,5 μm de diámetro. Son fácilmente reconocibles por su contorno redondo, color rojo brillante y palidez central que le da forma de dona. En condiciones normales, una palidez central ocupa cerca de un tercio de todo el diámetro de la célula.

El proceso de maduración total del glóbulo rojo tarda alrededor de siete días y sobrevive en circulación por 120 días antes de ser atrapado por el bazo, donde sufre catabolismo y el hierro se vuelve a reutilizar.

FROTIS SANGUÍNEO

Con el desarrollo reciente de equipos sofisticados para la realización del cómputo de células sanguíneas y de sus respectivos índices, la proporción de muestras que requieren análisis de un frotis sanguíneo ha ido en disminución constante y en algunos casos clínicos su porcentaje es inferior al 15%. Sin embargo, aun en plena era molecular, el examen del frotis sanguíneo resulta crucial e insustituible como herramienta para el diagnóstico clínico.

Su análisis es tan importante que los hematólogos dedican días durante sus congresos a la evaluación de casos de citomorfología. Por esta razón, nunca debe menospreciarse este análisis ni sus hallazgos, ya que el observador aporta hallazgos que no pueden ser dados por un equipo automatizado.

En comparación con el procedimiento automatizado del cómputo de células sanguíneas, el examen del frotis sanguíneo por parte de un experto, es un proceso que requiere mayor tiempo y trabajo; por lo tanto, es más costoso, por lo que es importante que se definan las condiciones bajo las cuales se requiere solicitar su análisis.

De tal forma, cada centro médico debe definir los protocolos para la realización o no del análisis del frotis sanguíneo. Estos protocolos deben ser elaborados en conjunto por médicos, microbiólogos y otros profesionales de la salud, en concordancia con los requerimientos de agencias reguladoras, leyes locales o internacionales y el impacto económico de estas.

Por lo general, este análisis se realiza como parte de una evaluación médica para ayudar a diagnosticar ciertas enfermedades o bien, para verificar si un paciente posee alguna alteración hematológica.

En el Cuadro N° 1 se mencionan algunas circunstancias en las cuales se considera necesaria la realización del frotis sanguíneo.

Cuadro N° 1. Indicaciones clínicas para el examen del frotis sanguíneo

- Características sugestivas de anemia, ictericia inexplicada o ambas.
- Características sugestivas de enfermedad drepanocítica: dactilitis, esplenomegalia repentina o palidez, dolor abdominal, de pecho o de extremidades.
- Características sugestivas de trombocitopenia (petequias) o neutropenia (infección severa).
- Características sugestivas de linfoma o enfermedad linfoproliferativa.
- Características sugestivas de enfermedad mieloproliferativa.
- Sospecha de coagulación intravascular diseminada.
- Falla renal aguda o aumento inexplicado del tamaño renal, sobre todo en niños.
- Examen de la retina con signos de hiperviscosidad, atrofia, exudado o hemorragia.
- Sospecha de infección bacteriana o parasitaria que pueda diagnosticarse al frotis.
- Características sugestivas de cáncer no hematopoyético diseminado: pérdida de peso, dolor óseo.

Preparación, tinción y análisis del frotis sanguíneo

El uso de los colorantes en las preparaciones de sangre se deriva de un descubrimiento de Paul Ehrlich, que permitió reconocer y clasificar varios tipos celulares, lo que representó un gran avance en la hematología.

Actualmente, son muchos los métodos empleados para diferenciar las finas estructuras de las células de la sangre. Entre ellos, algunos son simples colorantes que se fijan a diversas estructuras y otros son verdaderas reacciones químicas.

Para la coloración se aprovechan los diferentes pH de las estructuras celulares, dependiendo de si son ácidas, básicas o neutras. Es importante tener en cuenta que las organelas básicas se impregnan por los colorantes ácidos y por eso se denominan acidófilas. Los núcleos siempre son ácidos, por lo que toman colorantes básicos, y los citoplasmas se tiñen generalmente con los colorantes neutros. Las granulaciones pueden dar reacciones específicas o presentar afinidad para determinados colorantes.

Una simple mezcla de azul de metileno y eosina originó la mezcla conocida como colorante de Romanowsky. Esta mezcla original ha sufrido modificaciones (Giemsa, May Grunwald, Wright, Leishman); sin embargo, ninguna se aparta de la naturaleza original de Romanowsky.

Preparación del material

- Los portaobjetos deberán estar muy limpios y completamente desengrasados.
- Para identificar las muestras, se recomienda escribir el nombre o número del paciente con lápiz de grafito.

Preparación del frotis

Para hacer el frotis se procede de la siguiente forma: con uno de los bordes de una lámina preferiblemente biselada, se toma una gota de sangre y se apoya sobre la superficie de otra lámina, formando un ángulo de 30 grados. Se deja que la gota se extienda a lo largo de dicho borde. Con movimiento rápido se empuja la lámina superior hacia el extremo de la inferior y se deja secar al aire al menos de cinco minutos antes de teñir (Figura N° 1).

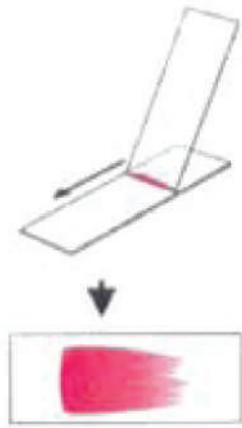


Figura N° 1. Preparación del frotis de sangre periférica.

Las preparaciones deben ser examinadas primero a bajo poder, con el fin de determinar la distribución de las células y corroborar la homogenización de la muestra y la calidad de la tinción. Aun para el observador más experimentado, una preparación defectuosa no tiene valor y puede dar lugar a grandes errores. Si la preparación es satisfactoria, se selecciona un área para hacer el examen detallado con el objetivo de inmersión.

Un microscopio de calidad y un frotis bien hecho son esenciales para poder observar e interpretar bien un extendido sanguíneo.

Los eritrocitos

Las variables a estudiar son: tamaño, forma y concentración de la hemoglobina o madurez de estos (color).

Color (cromía)

El color de los eritrocitos (hipo o hipercromía) puede ser estimado por medio del valor que se obtenga con la determinación de la concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) cuando la determinación es manual y de la hemoglobina corpuscular media (HCM) si es con analizador automatizado. No obstante, el estudio del frotis debe ser forzosamente el índice que indique la calidad hemoglobínica de los eritrocitos. De existir hipocromía se reportará de una a cuatro cruces, siendo una cruz lo más leve y cuatro cruces lo más intenso.

La policromatofilia (basofilia difusa), el punteado basófilo, los anillos de Cabot, los cuerpos de Howell Jolly, la presencia de eritroblastos y el fenómeno de Rouleaux, también deben de ser consignados al final del reporte.

Tamaño

El glóbulo rojo normal tiene un diámetro promedio (una vez teñido) de 7,5 μm , que varía entre los 6,5 y 8,2 μm . Con experiencia, este puede ser determinado con suficiente facilidad bajo las categorías de microcito, normocito, macrocito o megalocito.

La variación del tamaño se expresa en término de anisocitosis y es reportada de una a cuatro cruces. Correlaciona con el volumen corpuscular medio (VCM), pero se debe recordar que los equipos calculan un valor promedio, por lo que los hallazgos morfológicos prevalecen sobre los datos del equipo.

En términos generales, se considera microcito cuando hay un VCM menor a 80 fl o a 6 μm de diámetro, y macrocitos si el VCM es mayor a 100 fl o a 8 μm de diámetro.

Cabe mencionar que los megalocitos son glóbulos rojos con diámetros superiores a los 10 μm y en las anemias por deficiencia de vitamina B₁₂ generalmente son ovalados.

Forma

Se expresa en términos de poiquilocitosis, la cual debe ser estimada y reportada de una a cuatro cruces. Se anota primero la forma que prevalece y de último la menos frecuente.

Los codocitos se reportan completamente aparte, junto con otras observaciones, si las hubiera.

Los glóbulos rojos espiculados son un subgrupo de poiquilocitos. Estas formas tienen en común la presencia de al menos una proyección puntiaguda y son indicadores de un proceso patológico significativo (la única excepción son los equinocitos, que también pueden formarse como artefactos durante la preparación del frotis).

Estas alteraciones morfológicas no están confinadas al sistema hematopoyético, sino que son indicadores de disturbios en el metabolismo (abetalipoproteinemia, deficiencia de vitamina E) o de función (mixedema, úlceras sangrantes, quemaduras), o bien, pueden estar asociadas a procesos malignos (carcinoma gástrico, desórdenes mieloproliferativos) o a intervenciones terapéuticas (terapia con heparina, válvulas cardíacas).

Como se observa en el Cuadro N° 2, las alteraciones en la forma de estos eritrocitos suelen estar relacionadas con barreras físicas que estos deben cruzar: el bazo, la médula ósea, la fibrina en el torrente sanguíneo o las válvulas cardíacas artificiales.

Cuadro N° 2. Eritrocitos espiculados: morfología y condiciones asociadas		
Nombre	Descripción	Condición asociada
Acantocito	Esferoidal, de 2 a 20 espículas de variable longitud e irregularmente distribuidas. No tiene palidez central.	Abetalipoproteinemia, enfermedad del parénquima hepático, mala absorción de grasas, mixedema, desórdenes mieloproliferativos, retinitis pigmentosa, ausencia de bazo.
Equinocito	De 10 a 30 espículas cortas distribuidas homogéneamente.	Artefacto, uremia, carcinoma gástrico, úlcera sangrante, enfermedad hepática, deficiencia de PK, deficiencia de vitamina E, terapia con heparina.
Dacriocito	Presencia de una única espícula que le da forma de lágrima.	Mielofibrosis, mieloptisis anémica y talasemias.
Drepanocito	En forma de hoz o de bote, con terminaciones puntiagudas en ambos extremos y con citoplasma denso.	Síndromes drepanocíticos.
Célula en casco	Puede tener proyecciones en ambos extremos; si estas son lo suficientemente largas se llama queratocito.	Anemia hemolítica microangiopática (CID, PTT), hemólisis por válvulas cardíacas, quemaduras severas, anemia hemolítica por cuerpos de Heinz, glomerulonefritis, hemangiomas cavernosos.
Queratocito	Una o dos abolladuras con proyecciones en ambos extremos.	Las mismas que las células en casco.
Esquistocito	Célula fragmentada con una o más espículas, sin palidez central. Son las células en casco, los queratocitos y los triangulocitos.	Las mismas que las células en casco.

INCLUSIONES ERITROCÍTICAS

A continuación se describen las inclusiones que se pueden observar en eritrocitos teñidos con el colorante de Wright-Giemsa. Las inclusiones que solo son posibles de observar con tinciones como la supravital, para hierro u otras (cuerpos de inclusión, siderosomas, etc.), no son objeto de este capítulo, como tampoco lo son las inclusiones parasitarias.

Anillos de Cabot

Son líneas delgadas en forma de anillo, asa o número ocho. A menudo son concéntricas y generalmente únicas, aunque en ocasiones son múltiples. Son bien definidas y se tiñen de rosado con los colorantes derivados del Romanowsky (Wright). Se observan sobre todo en las anemias megaloblásticas, síndromes mielodisplásicos y después de esplenectomía.

Cuerpos de Howell Jolly

Corresponden a fragmentación nuclear o a cromoso-

mas aberrantes a manera de un corpúsculo excéntrico. Son más grandes que los cuerpos de Pappenheimer y tienen bordes redondos. Están compuestos de ADN. En las anemias megaloblásticas o síndromes mielodisplásicos se pueden ver múltiples cuerpos, aunque suelen observarse de manera individual.

Punteado basófilo

Corresponden a cúmulos de ribosomas y polirribosomas. En intoxicaciones por plomo y en las talasemias son propensos a agregarse, aunque pueden observarse en otras situaciones que tengan producción eritrocítica acelerada y patológica.

Cuerpos de Pappenheimer

Son gránulos sideróticos (partículas que contienen hierro) visibles con la tinción Wright-Giemsa. Son depósitos pequeños e irregulares que se pueden observar en eritrocitos y eritroblastos. Miden menos de 1 μm , por lo que son más pequeños que los cuerpos de Howell Jolly. La tinción de Wright-Giemsa tiñe la matriz

proteica de los gránulos, los cuales se tiñen positivos con la tinción de azul de prusia cuando contienen hierro.

Cristales de hemoglobina C

Son distintivos, pero variables. Su hallazgo es patognomónico de la enfermedad por hemoglobina C, y rara vez se pueden ver en los dobles heterocigotos SC. En los pacientes esplenectomizados u homocigotos para la hemoglobina C, hasta el 10% de los eritrocitos en circulación contienen estos cristales tetraédricos. A diferencia de los polímeros de la hemoglobina S, los cristales de hemoglobina C están compuestos por oxihemoglobina.

LOS LEUCOCITOS

Se estudian de acuerdo a su número, tipos, anomalías morfológicas, presencia de inclusiones intracitoplasmáticas, entre otros. Con respecto al número, en un frotis bien hecho no es posible darse cuenta de la cantidad de estos elementos. Obviamente, este análisis no debe sustituir el cómputo absoluto de leucocitos determinado por los métodos tradicionales o en forma automatizada.

El recuento diferencial leucocitario se hará con objetivo de inmersión y de acuerdo con los principios que se han enumerado para realizar una fórmula diferencial. El número absoluto se obtendrá multiplicando el cómputo total de los leucocitos por el porcentaje obtenido en la fórmula diferencial. Solo los cálculos absolutos definen las eosinofalias, las neutropenias, las neutrofilias y otras.

LOS TROMBOCITOS O PLAQUETAS

El número de plaquetas se estima aproximadamente y puede reportarse como normales, aumentadas o disminuidas al frotis si no se tiene un equipo automatizado; sin embargo, de preferencia, y siempre que se disponga de esos equipos, debe reportarse su concentración como parte integral del hemograma, así como todas las anomalías con respecto a su tamaño y granularidad.

En el Cuadro N° 3 se mencionan algunos hallazgos en el frotis que pueden ser de importancia diagnóstica.

Cuadro N° 3. Observaciones fortuitas de importancia diagnóstica

- Glóbulos rojos fragmentados.
- Hipoesplenismo.
- Crioglobulina (que podría indicar infección con hepatitis C o neoplasia de células plasmáticas).
- Aglutinación de glóbulos rojos (aglutininas frías, infección por micoplasma, mononucleosis o desorden linfoproliferativo).
- Presencia de células leucémicas, linfoma o mieloma.
- Infección por parásitos (malaria, babesiosis, leishmaniasis, tripanosomiasis, filariasis).
- Bacterias (infección por *Ehrlichia*, meningococos o pneumococos).

ESTUDIO DE LA MÉDULA ÓSEA (EL MIELOGRAMA)

Organización de la médula ósea

Antes de formarse las cavidades óseas durante el quinto mes de la vida fetal, tiene lugar la formación de células de la sangre en el saco vitelino y más tarde en el hígado. Durante la breve fase de saco vitelino, los eritrocitos producidos son nucleados y contienen hemoglobinas embrionarias. Los producidos por el hígado, bazo y médula ósea, son células no nucleadas que contienen hemoglobina fetal. Entre el tercer y séptimo mes de vida embrionaria, el bazo participa en la

formación de células de la sangre. Al nacer, las fases esplénica y hepática han terminado y todas las cavidades óseas trabajan activamente en la producción de células sanguíneas.

Durante la vida adulta, la expansión de las cavidades óseas continúa a causa de la resorción de hueso y hay un aumento gradual en la cantidad de tejido graso existente. Rara vez tiene lugar una reactivación de zonas extramedulares y cuando esto ocurre, la hematopoyesis es inadecuada, más que compensatoria.

La médula ósea llena la cavidad de todos los huesos al nacimiento, y entre los cinco y siete años de edad

el tejido adiposo va desplazando la médula roja. En el adulto la médula ósea activa se encuentra en las vértebras, costillas, esternón, cráneo, omóplato, clavículas, huesos ilíacos y epífisis proximales del fémur y del húmero. Además, conforme avanza la edad, la médula de estos huesos cambia su contenido en tejido graso.

La cavidad medular de los huesos está dividida en compartimientos por las trabéculas óseas, en cuya luz hay material gelatinoso rico en grasa que contiene las células hematopoyéticas. La cantidad de médula ósea activa en el adulto oscila entre 3,4% y 5,9% del total del peso, lo que indica que el peso de la médula ósea equivale aproximadamente al del hígado.

La médula puede incrementar su capacidad de producción de seis a doce veces, aumentando su tejido hematopoyético y reduciendo las cavidades grasas, acortando el tiempo de maduración y, tal vez, acelerando también el tiempo de regeneración celular.

Obtención del material medular

La médula ósea normal es suave y semifluida, por lo cual puede ser removida fácilmente por aspiración y por biopsia para estudios por parte del patólogo.

Aspiración

Este es el procedimiento usual para estudios de médula ósea. De los múltiples sitios que pueden ser utilizados para obtener el material, los preferidos son el tercio superior de la tibia en el lactante, las crestas ilíacas anteriores y posteriores en los niños y adolescentes, y las crestas ilíacas y el esternón en los adultos.

Para obtener material se pueden utilizar agujas de diversos tamaños y se puede extraer el material con la ayuda de jeringas. Es necesario esterilizar adecuadamente la zona y actuar en todo momento con una técnica aséptica. Algunos utilizan anestésicos locales; sin embargo, el dolor que causa la extracción no se disminuye. La aguja se debe introducir siempre con mandril para que no se obstruya con el hueso. Hasta que se sienta que se está en la cavidad medular, se quita el mandril y se aspira de 0,2 ml a 0,5 ml con la jeringa; luego se saca junto con la aguja. Se hacen los frotis inmediatamente para evitar que el material se coagule y se cultiva una porción de este en caso que se requiera. Nunca debe aspirarse mucha médula, pues existe mayor probabilidad de diluir el material con sangre circulante.

Biopsia

La biopsia medular se hace cuando el material obtenido por aspiraciones repetidas es inadecuado o cuando

se desea obtener una mayor cantidad de médula. En este caso se utiliza el método de trepanación con una aguja para biopsia (Vim-Silverman, Jamshidi, etc.), teniendo todos los cuidados que se requieren para la aspiración.

La muestra extraída debe enviarse rápidamente al Servicio de Patología para los cortes respectivos. Parte del aspirado o de la biopsia se puede utilizar para realizar cultivos, en caso de que se requieran.

Preparación de material

Inmediatamente después de aspirado el material, se colocan pequeñas gotas en varios portaobjetos limpios, sobre las cuales se coloca otro portaobjeto de manera transversal; al irse extendiendo, la gota corre rápidamente en el portaobjetos de arriba. Así, el material queda distribuido en forma homogénea, lo cual no se logra si el frotis se realiza en rodillo, como se hacen los extendidos de sangre periférica.

Cuando se desea analizar el hierro de depósito en médula ósea, deben hacerse frotis muy gruesos y ponerlo a escurrir después en forma vertical, para reducir ligeramente el grosor y dejar todos los grumos medulares de la laminilla.

Análisis del material y reporte del mielograma

La información que se obtiene del análisis rutinario de una médula ósea incluye la estimación de bajo poder de la celularidad, el conteo y la observación de la morfología de los megacariocitos para evaluar su diferenciación plaquetaria; y a alto poder el detalle morfológico y el cómputo de todos los elementos celulares, así como la estimación de los depósitos de hierro y la búsqueda e identificación de células tumorales, células de depósitos, parásitos y granulomas.

Cabe destacar que el cómputo de células en médula ósea se realiza con mucho cuidado, debido a la gran variación en el material extraído. Por esa razón, se estudia la diferenciación plaquetaria de varios de los megacariocitos y se elige una zona adecuada para hacer el diferencial celular.

Para el análisis de parásitos, depósitos de hierro, células ectópicas e incluso para saber si la muestra es realmente médula, deben buscarse grumos y partículas medulares que por lo general tienen fibroblastos, células plasmáticas y linfocitos.

Otro dato que se obtiene del análisis de la médula ósea es la relación mieloide-eritroide (G:E) entre el número total de células granulocíticas y las eritrocíticas. Esto se obtiene dividiendo el número de las primeras por el

número de las segundas. La relación (G:E) en el adulto es de 2 a 7 (en promedio 3,5); al nacimiento es de 1,8 a 2,5, y al año de vida es de 3. Lógicamente, los linfocitos no se toman en cuenta para obtener este índice.

Una parte importante en el reporte son las observaciones cualitativas que se anotan al pie. En ellas se detalla el tipo de celularidad; la funcionalidad de los megacariocitos; las alteraciones morfológicas observadas; si hay diseritropoyesis o mielodisplasia; si exis-

te aumento o disminución relativas o absolutas de una serie; y si hay parásitos o células anormales (especificando de que tipo). Además, se apunta la impresión diagnóstica de la médula analizada (Figura N° 2).

Cabe mencionar que la aspiración y la biopsia son procedimientos que no se excluyen en el diagnóstico hematológico (Cuadros N° 4 y N° 5). El aspirado da mejor idea de la citología, mientras que la biopsia lo da de la histoarquitectura, ya que permite hacer diagnósticos que no son evidentes en la aspiración.

CAJA COSTARRICENSE DE SEGURO SOCIAL
Hospital Nacional de Niños "Dr. Carlos Sáenz Herrera"
Laboratorio de Estudios Especializados e Investigación

MIELOGRAMA

Nombre		N° Registro		Servicio	
		Rango nl. (%)			Rango nl. (%)
Blastos			Linfocitos		11.1-23.2
Células precursoras		0-5.0	Plasmocitos		0.4-3.9
Promielocitos		2.1-4.1	Monocitos		0-0.8
Mielocitos		8.2-15.7	Histiocitos		0-0.9
Metamielocitos		9.6-24.6	Eritroblastos		18.4-33.8
En banda		9.5-15.3	Relación M:E		1.5-3.3
Segmentados		6.0-12.0	Hemosiderina:		
Eosinófilos		1.2-5.3			
Basófilos		0-0.2			
Celularidad	Trama medular:				
Megacariocitos (en número):	con trombopoyesis				
OBSERVACIONES:					
IMPRESIÓN DIAGNÓSTICA:					

Firma _____ Fecha _____

Fórm. 1256 07/03 LMS

Figura N° 2. Reporte de mielograma, Caja Costarricense de Seguro Social (CCSS).

**Cuadro N° 4. Aspiración de médula ósea:
información citológica**

1. Celularidad y megacariocitos.
2. Evaluación cualitativa de la hemopoyesis.
3. Detección de células anormales y grumos metastásicos.
4. Evaluación de las reservas de hierro y de sideroblastos.
5. Investigación citoquímica.
6. Parásitos y otras observaciones.

Cuadro N° 5. Biopsia de médula ósea: información histológica

1. Celularidad: en especial en condiciones hipoplásicas (anemia aplásica), porcentaje de grasa.
2. Arquitectura: localización y relación de las tres series, obtención de la relación G:E.
3. Asentamiento de un linfoma maligno o de enfermedad de Hodgkin.
4. Asentamiento de metástasis neoplásicas.
5. Detección de desórdenes mieloproliferativos (mielofibrosis -reticulina-), y de reacciones fibróticas (Hodgkin o carcinoma metastático).
6. Diagnóstico de enfermedades caracterizadas por granulomas: sarcoidosis, tuberculosis.
7. Evaluación morfológica ósea en mieloma, hipertiroidismo y enfermedad primaria de hueso (Pager).

Médula ósea en infantes y niños

El mejor sitio para obtener muestras de médula ósea en niños es la cresta ilíaca. Fácilmente, se puede obtener 0,2 ml de médula. Es necesario administrar algún sedante al paciente antes del procedimiento, así como anestesia local en el sitio de la punción. En niños muy aprehensivos, una pequeña anestesia general puede ser necesaria. Para infantes menores de seis meses, la punción se aconseja en la tibia.

Las características generales del mielograma en estas edades son las siguientes:

1. La médula es celular, pero hay gran variación.
2. En las primeras dos semanas los eritroblastos son muy numerosos.
3. Los eritroblastos disminuyen rápidamente después del nacimiento y los granulocitos comienzan a ser más numerosos, como sucede en la médula de los adultos. Formas jóvenes (progranulocitos y aún mieloblastos) son comunes en niños jóvenes (menos del 10%).
4. Hay una definitiva fase linfocítica (20% a 50%), que empieza en el segundo mes, pero que es mayor entre el primer y el tercer año de vida.
5. Después de los tres a cinco años de edad, la médula ósea ofrece un cuadro muy semejante al del adulto.
6. Los plasmocitos y monocitos son más frecuentes en la médula normal de los niños que en los adultos.

En condiciones de enfermedad, debe recordarse que el cuadro medular en niños es mucho más lábil que en los adultos y que grandes variaciones son posibles en respuesta a infecciones.

Estudio microscópico

El estudio microscópico es útil para determinar:

1. Estado de los elementos reticulares, macrófago-histiocítico y de las células plasmáticas.
2. Granulopoyesis: condición de las células, tipo de maduración, anomalías morfológicas, predominio de algún tipo celular, etc.
3. Eritropoyesis: condición celular, tipo de maduración, elementos anómalos y otros.
4. Trombopoyesis: número y estado funcional de los megacariocitos, estado morfológico de los trombocitos, etc.
5. Células anormales: de tipo neoplásico, granulomatoso, etc.
6. Parásitos: plasmodium, leishmania, histoplasma, etc.

El aspecto descriptivo de la médula ósea es la parte del reporte más importante y de más cuidado en el análisis de un frotis de médula, ya que con base en este el médico hematólogo hará el diagnóstico clínico y evaluará la respuesta terapéutica. Al microbiólogo, por lo tanto, le corresponde dar el diagnóstico citológico y no el nosológico, y para ello es fundamental que siempre relacione los análisis de sangre periférica y la clínica con los datos obtenidos del estudio medular.

Justificaciones para realizar el análisis de la médula ósea

El análisis de la médula ósea está indicado en:

1. Anemia macrocíticas megaloblásticas.
2. Evidencias clínicas de discrasias sanguíneas (en caso de linfadenopatías inexplicables, esplenomegalia, hepatomegalia, etc.).

3. Casos de anemia, trombocitopenia o leucopenia inexplicables.
4. En toda pancitopenia.
5. Hallazgos de sangre periférica que sugieren leucemia (anemia, trombocitopenia, etc).
6. Evidencia radiológica de lesiones óseas causadas por discrasias sanguíneas.
7. Carcinomas, con o sin evidencia radiológica de metástasis.
8. Para identificar parásitos encontrados en ocasiones en médula ósea.
9. Investigación bacteriológica e histológica de granulomas.
10. Anemias por deficiencia de hierro (para estimar el contenido de hierro en médula).
11. Antes de una esplenectomía para determinar el estado funcional de la médula ósea.
12. Para el diagnóstico de las enfermedades por almacenamiento de lípidos (Gaucher, Niemann Pick).
13. Para seguir el progreso terapéutico en anemias, leucemias, etc.

Importancia del mielograma

El mielograma es útil para:

1. Diagnóstico en enfermedades hematológicas y no hematológicas.
2. Corroborar diagnósticos hechos en sangre periférica.
3. Aclarar diagnósticos cuando la sangre periférica no es concluyente.
4. Definir citopenias y anemias sin reticulocitos.
5. Calificar la maduración de las líneas hematopoyéticas y destacar la displasia y la neoplasia.
6. Definir claramente el estado de las reservas de hierro.
7. Evaluar resultados del tratamiento antineoplásico.

El mielograma no es de gran ayuda en la anemia hemolítica (no asociadas a leucemias o linfomas), ni en la leucemia linfocítica crónica (los análisis histológicos

de los nódulos linfáticos son más satisfactorios). Además, está contraindicado en los hemofílicos y en otros desórdenes hemorrágicos relacionados.

Clasificación del estado de las reservas de hierro (hemosiderina)

Las reservas de hierro deben estudiarse en preparaciones adecuadas del material medular, a efecto de poder evaluar tanto en el estroma (hierro tisular o macrofágico) como en el eritrón fijo (sideroblastos). Con experiencia la clasificación será:

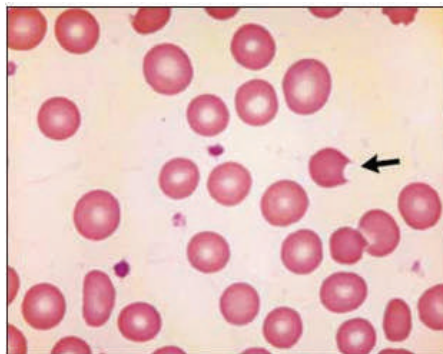
1. Normal.
2. Presente pero disminuido.
3. Ausente.
4. Aumentadas.
5. Hemosiderosis (muy aumentadas).

En cuanto al eritrón, normalmente se aprecia pocos granulillos en el 20-50% de los eritroblastos tardíos, la eritropoyesis puede ser sideropénica, sideroblástica o normosideroblástica. Ambas mediciones son indispensables en el abordaje diagnóstico del cuadro anémico en estudio.

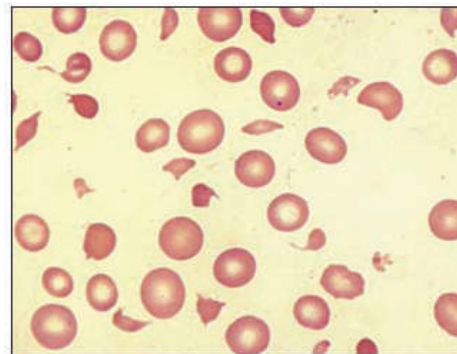
Patrón del hierro tisular y sideroblástico en médula ósea

1. Ausencia de hierro tisular (sistema macrofágico): anemia ferropriva.
2. Aumentado en la serie monocito-macrófago (SMF) y en serie roja: sobrecarga de hierro.
3. Anemias hemolíticas, anemias refractarias, talasemias, hemocromatosis post-transfusional, terapia parenteral de hierro, anemias megaloblásticas.
4. Aumentado en SMF y disminuido o ausente en serie roja: anemia de la enfermedad crónica.
5. Aumentado en serie roja o disminuido en el tisular (SMF): por disminución del estroma mieloide, mielofibrosis y leucemia mieloide crónica.

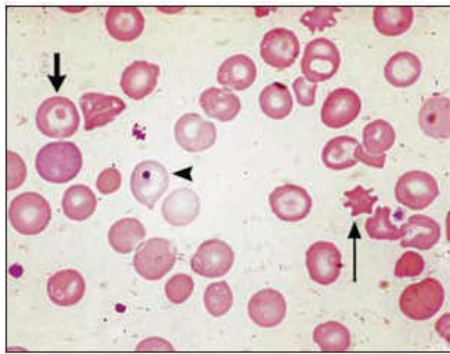
Imágenes



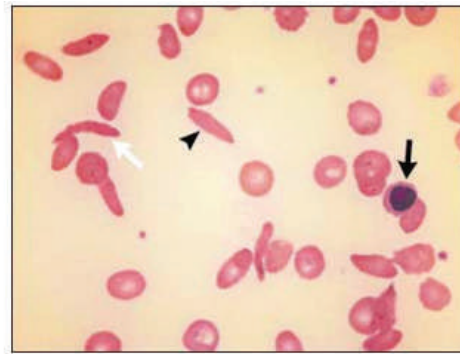
Deficiencia de G6PD:
Prequeratocitos



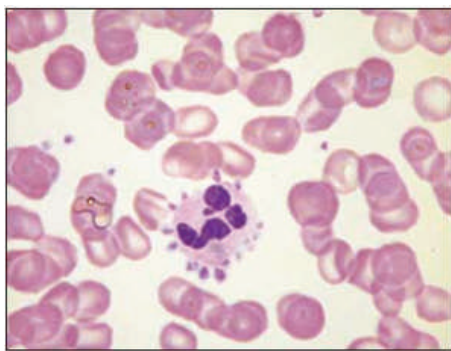
Anemia hemolítica
microangiopática



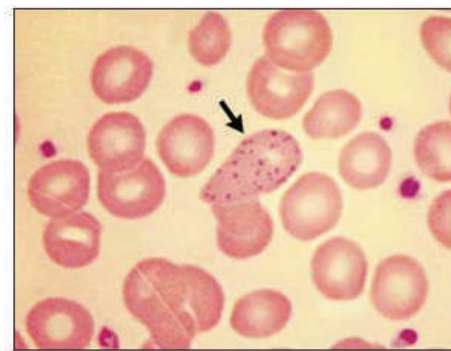
Hipoesplenismo:
acantocitos, cuerpos de
Howell-Jolly y codocitos



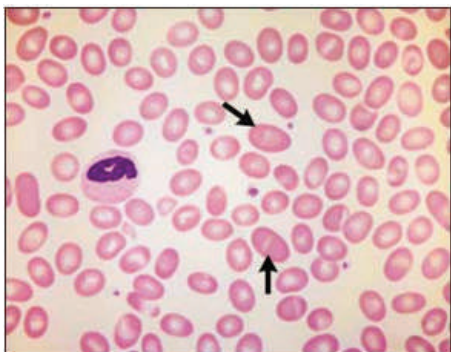
Drepanocitosis:
formas en barco y células
falciformes



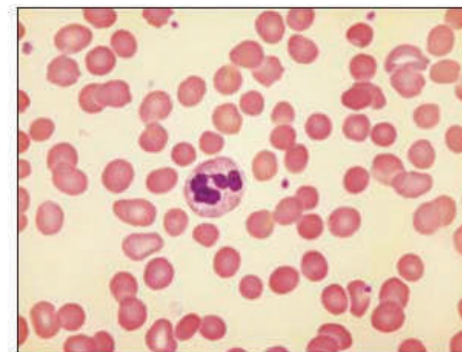
Satelitismo plaquetario



Punteado basófilo en
intoxicación por plomo



Ovalocitosis



Esferocitosis hereditaria

BIBLIOGRAFÍA

Bain B. Diagnosis from the blood smear. N Engl J Med 2005; 353(5): 498-507.

Bain BJ. British Society for Haematology, slide session, Annual Scientific Meeting, Edinburgh, 2006. Clin Lab Haematol 2006; 28(6): 363-369.

Glassy EF. Color atlas of hematology: an illustrated field guide based on proficiency testing. Northfield, Ill: College of American Pathologist; 1998.

Hutchinson CV, Brereton ML, Burthem J. Digital imaging of haematological morphology. Clin Lab Haem 2005; 27(6): 357-362.

Manascero AR. Hematología herramienta para el diagnóstico: Atlas de morfología celular, alteraciones y enfermedades relacionadas. Bogotá: Centro Editorial Javeriano; 2003.

Michael J, Sabyasachi S. Fisiología humana. México: Manual moderno; 2012.

MÉTODOS DE ESTUDIO DEL METABOLISMO DEL HIERRO

Dr. Luis A. Mora Bermúdez
Dra. Sandra M. Boza Oreamuno

INTRODUCCIÓN

En la práctica clínica resulta de gran utilidad la determinación del hierro sérico (FeS), que indica la cantidad de hierro unido a la transferrina (Tf), así como la determinación de la capacidad total de fijación del hierro a la transferrina (CTFFe), la cual mide la Tf funcional.

El índice de saturación de la transferrina (IS), por su parte, también es importante, porque da más información que un valor aislado del FeS.

Para la determinación del FeS y de la CTFFe existen muchos métodos, pero en términos generales, todos incluyen tres fases analíticas: separación del Fe^{+3} de la Tf, reducción del Fe^{+3} y reacción del Fe^{+2} con algún cromógeno.

Dentro de las sustancias que se utilizan para reducir el hierro se encuentran: el ácido ascórbico; la hidrazina; el ditionito; el sulfito de sodio; la hidroxilamina; y el ácido tioglicólico. Respecto a los cromógenos, los más recomendados por su mayor sensibilidad (dada la alta absorptividad molar (E) del complejo Fe^{+2} -cromógeno) son: la batofenantrolina (4,7 difenil 1,10 fenantrolina) en su forma sulfonatada soluble en agua; la ferrocina (3,2 piridil) 5,6 bis (4 fenil); el ácido sulfónico y la terosita 2,6 bis (4 fenil 2,2 piridil) 4 fenil piridina.

En cuanto a la determinación de hierro por espectroscopia de absorción atómica (EAA), se ha notado que este método presenta limitaciones de sensibilidad, de interferencia por matriz, de incapacidad para distinguir el hierro de la hemoglobina del hierro de la transferrina y, obviamente, de costos. En contraposición a este procedimiento, los colorimétricos son más prácticos, rápidos y sensibles. Hace unos años se propuso un nuevo método de EAA que elimina algunos de los factores interferentes señalados.

Toda la cristalería empleada en esta determinación debe ser libre de hierro, y en la preparación de reactivos hay que usar agua desionizada. Se recomienda el uso de pipetas automáticas; en este caso, las puntillas utilizadas se colocan en agua con jabón neutro y luego se lavan con agua del tubo y agua desionizada; no es necesario ponerlas en ácido.

CUANTIFICACIONES DE FeS, CTFFe E IS

Método de Beale y colaboradores

(Modificado por Loría y Monge; por Sáenz et al en el Centro de Investigación en Hemoglobinas Anormales y Trastornos Afines (CIHATA) de la Universidad de Costa Rica; y por el Laboratorio de Estudios Especializados en Investigación (LEEI) del Hospital Nacional de Niños, para adaptarlo a micrométodo)

Preparación de cristalería libre de hierro

- Sumergir la cristalería limpia en HCl al 25% o en HNO_3 al 50% toda la noche.
- Quitar el ácido (se puede reutilizar muchas veces) y lavar con agua del tubo unas seis veces.
- Lavar luego con agua destilada tres veces y con agua desionizada tres veces; secar en un horno.

Preparación de reactivos

Tampón glicina-HCl pH 1,9 (mantener a 4 °C)

- Glicina (Sigma): 15,0 g.
- Agua desionizada: 800 ml, disolver y llevar a pH 1,9 con HCl 1 N (cerca de 150 ml).
- Aforar a 1.000 ml con agua desionizada.

Disolución de batofenantrolina

- Batofenantrolina*: 0,60 g.
- Agua desionizada csp: 100 ml.
- Guardar en botella ámbar a 4 °C.

* Bathophenanthroline Disulfonic acid (4,7 Diphenyl 1,10 phenanthroline- Disulfonic Acid) (Sigma N° B-1375).

Disolución madre de hierro (10.000 ug/dl)

- Sulfato amónico ferroso $6\text{H}_2\text{O}$: 0,1755 g.
- H_2SO_4 concentrado: 1,25 ml.
- Dejar en reposo unos 20-30 minutos para facilitar la disolución de la sal.
- Agregar cerca de 150 ml de agua desionizada;

mezclar hasta que se disuelva.

- Valorar con una disolución diluida de permanganato de potasio, hasta que una sola gota produzca un tono rosado estable. Aforar a 250 ml. Mantener a 4 °C en botella ámbar.

**Patrón (P) de 250 ug/dl
(botella ámbar, temperatura ambiente)**

- Disolución madre de hierro: 2,5 ml.

- Agua desionizada csp: 100 ml.

Preparación del tampón de trabajo

**Tampón glicina-HCl pH 1,9/ácido ascórbico
(Sigma)**

A continuación se dan algunos ejemplos de las proporciones a utilizar:

N° tubos*	ml agua desionizada	ml de tampón	mg ácido ascórbico
13	18	9,0	0,0920
17	22	11,0	0,1120
21	26	13,0	0,1320
33	38	19,0	0,1920
41	46	23,0	0,2320
45	50	25,0	0,2520

* Depende del número de muestras a analizar.

En caso de que no se utilice toda la disolución de trabajo, se puede reutilizar, siempre y cuando se congele inmediatamente (entre -20 a -25 °C). Se recomienda que descongelar al momento de usar, para prevenir la descomposición del ácido ascórbico. En todo caso, es preferible utilizar disolución de trabajo recién preparada.

Tipo de muestra

Se emplea suero de una muestra obtenida en ayunas. El FeS puede ser una tercera parte más alto en la mañana que en la noche, debido principalmente a variaciones en la entrega de hierro a la Tf por las células del sistema monocítico- macrofágico (SMM). Por eso, se recomienda la toma matutina de la muestra, por ser esta la condición en la que se han establecido los valores de referencia.

Capacidad total de fijación del hierro (CTFFe)

Se recomienda iniciar con la determinación de CTFFe, a fin de obtener la Tf saturada (Tf sat), que luego se procesa igual que el FeS.

Fundamento de la prueba

A una muestra de suero se le agrega un exceso de hierro para saturar la Tf; el exceso de hierro no unido a Tf se elimina con carbonato de magnesio (MgCO_3)₄· $\text{Mg}(\text{OH})_2$ ·5H₂O (Sigma N° M-0125). El Comité Internacional de Estandarización en Hematología (ICSH)

recomienda el uso de carbonato de magnesio de la *Fisher Scientific Co.* y el de *Mallinckrodt*, debido a que son los menos sujetos a variaciones analíticas. En Costa Rica se ha trabajado con buen éxito los productos Sigma (M-0125) e Hycel (N° 299).

Es necesario confirmar el poder absorbente del carbonato de magnesio; para eso, se agregan 0,5 ml de disolución salina a un tubo que contiene 1 ml del estándar de hierro 250 ug/dl y luego de mezclar, se le adicionan 130 mg de carbonato de magnesio; se mezcla y centrifuga; el sobrenadante deberá tener, si acaso, trazas de hierro.

Procedimiento*

- En un tubo de ensayo (16x100 mm) agregar 1 ml del patrón de hierro de 250 ug/dl y luego 0,5 ml de suero; mezclar y dejar en reposo por 10 minutos.
- Agregar 130 mg de carbonato de magnesio y mezclar por 15-20 segundos; dejar en reposo por cinco minutos.
- Centrifugar durante cinco minutos; el sobrenadante, que debe ser transparente, contiene la Tf saturada (Tf sat). Si al sacarlo se mezcla con el carbonato de magnesio, hay que volver a centrifugar.
- La cantidad de sobrenadante alcanza para procesar por duplicado cada muestra.

* Para el micrométodo (LEEI) se utiliza la mitad de las cantidades anteriores, continuando con el proceso de hierro sérico, también con la mitad de los volúmenes.

Hierro sérico**Fundamento**

El hierro (Fe) se disocia de la Tf a pH < 5 (a pH > 7 la unión hierro-transferrina es estable); con este fin se usa el tampón glicina-HCl pH 1,9. El Fe liberado está como Fe⁺³ y el ácido ascórbico del tampón lo pasa a Fe⁺², que luego reacciona con la batofenantrolina,

formando un complejo coloreado, cuya intensidad de color es proporcional a la concentración de Fe de la muestra.

Procedimiento

1. En tubos de 12x75 mm, rotulados, se agrega, por duplicado, lo siguiente:

Tubo →	Blanco	Patrón	FeS	CTFFe
H ₂ O desionizada	0,5 ml**	---	---	---
Patrón 250 µg/dl*	---	0,5 ml**	---	---
Suero*	---	---	0,5 ml**	---
Tf saturada*	---	---	---	0,5 ml**
Tampón de trabajo	1,5 ml**	1,5 ml**	1,5 ml**	1,5 ml**

* Se recomienda hacer todos los análisis por duplicado.

**En el LEEI se ha utilizado con éxito la mitad de los volúmenes, haciendo ajustes como usar cubetas de 10x75 mm o tubos corrientes de este diámetro calibrados por transmitancia. El usar pequeños volúmenes de suero es de gran utilidad, sobre todo en el trabajo con niños, donde con frecuencia la obtención de muestras sanguíneas es una limitante.

2. Mezclar muy bien y hacer la primera lectura a 535 nm (A1).
3. Agregar una gota de batofenantrolina por tubo y mezclar; dejar en reposo a temperatura ambiente durante 25 minutos. Se aconseja agitar muy bien todos los tubos antes de leer nuevamente para

obtener la segunda lectura (A2).

Cabe mencionar que en el caso del micrométodo (LEEI) no se requiere disminuir la cantidad de la batofenantrolina.

Cálculos

$$\text{FeS } \mu\text{g/dl} = \frac{250 \mu\text{g/dl Patrón} \times (\text{A2-A1 del FeS})}{\text{A2-A1 del Patrón}}$$

$$\text{CTFFe } \mu\text{g/dl} = \left[\frac{250 \mu\text{g/dl Patrón} \times (\text{A2-A1 Tf sat.}) \times 3}{\text{A2-A1 del Patrón}} \right] *$$

* Se multiplica por tres porque el suero se diluyó 1:3

$$\% \text{ sat. Tf (IS)} = \frac{\text{FeS } \mu\text{g/dl}}{\text{CTFFe } \mu\text{g/dl}}$$

Cuidados que deben tenerse durante la determinación de FeS y CTFFe

- Lo ideal es usar muestras que no tengan hemólisis; sin embargo, muestras con una ligera hemólisis pueden ser utilizadas, porque el hierro hemoglobínico no interfiere si la determinación se hace dentro del tiempo previsto. Si la hemólisis es muy evidente, es preferible no usar la muestra. En todo caso,

si el suero es fresco se puede emplear, respetando estrictamente los tiempos de incubación, pues sobrepasados, el tampón ácido tiende a liberar hierro de la hemoglobina.

- Se pueden usar sueros ictericos sin necesidad de hacer correcciones, puesto que el método emplea el blanco de muestra; no obstante, sueros muy lipémicos ocasionan bastante interferencia con el método.

- El agua desionizada se prepara empleando resinas de intercambio iónico. El Comité Internacional de Estandarización en Hematología (ICSH) considera que el agua destilada puede ser satisfactoria.
- Hay patologías en donde la Tf puede estar 100% saturada; en estos casos, el valor del FeS es igual a la CTFFe. Nunca el FeS puede ser mayor que el valor de la CTFFe; tal situación indicaría un error en ambas determinaciones o que al paciente se le ha suministrado recientemente hierro intramuscular o por vía parenteral.
- Para control interno se recomienda hacer un pool de sueros (libres de hemólisis). Con este fin se obtienen 20 sueros en condiciones asépticas y se mantienen a 4 °C por 24-48 hrs. Al cabo de ese tiempo se filtran y se agrega 1 ml de thimerosal al

1% (preservante) a 80-120 ml del suero; se hacen alícuotas de 2 ml y se congelan a -25 °C. En estas condiciones, un lote de suero estudiado durante 34 semanas (29 análisis) dio los siguientes resultados: FeS $97,4 \pm 7,6$ µg/dl y CTFFe $311,5 \pm 5,9$ µg/dl.

Valores de referencia

- Al nacimiento, el FeS es de alrededor de 200 µg/dl, y baja a las pocas horas a un promedio de 50 µg/dl; después de las tres primeras semanas de vida los valores son iguales a los del adulto.
- En adultos sanos, Sáenz y colaboradores dan los siguientes valores de referencia:

	Mujeres	Hombres
FeS µg/dl	50-140	60-170
CTFFe µg/dl	270-430	270-430
IS	21-46	21-46

Importancia del índice de saturación de la Tf

En cuanto al IS, Loría y Monge hacen las siguientes observaciones:

- Un IS < de 10% indica deficiencia franca de hierro (anemia ferropriva).
- Un IS entre 10-15% puede deberse a deficiencia de hierro, infección o carcinoma (anemia de la enfermedad crónica -AEC-).
- Un IS entre 15-19%, generalmente señala infección o carcinoma.
- Un IS entre 20-40% con FeS bajo, indica desnutrición severa.
- Un IS superior a 60% indica falta de utilización (eritropoyesis disminuida o ineficaz) o sobrecarga de hierro (hemosiderosis o hemocromatosis).

Utilidad clínica de las determinaciones de FeS, CTFFe e IS

Estas determinaciones junto con la morfología eritrocítica y la evaluación de los depósitos de hierro en médula ósea, dan una idea satisfactoria de la condición del paciente.

Se debe recordar que los eritrocitos presentan hipocromía solo cuando la deficiencia de hierro es acen- tuada; cuando es moderada o ligera, la anemia puede ser normocítica normocrómica o microcítica normocrómica, pero ya se observa poiquilocitosis y un RDW alterado.

En el cuadro N° 1 se indica el comportamiento del FeS, del CTFFe y del IS en diferentes patologías.

Cuadro N° 1. FeS, CTFFe e IS en diferentes patologías			
Condición	FeS	CTFFe	IS
Deficiencia Fe	↓	↑↑↑	↓
Embarazo	N ↓	↑↑↑ ↑↑↑↑	↓ ↓
AEC	↓	N o ↓	↓ (variable)

Cuadro N° 1. FeS, CTFFe e IS en diferentes patologías

Condición	FeS	CTFFe	IS
Talasemias Anemias sideroblásticas	No ↑	No ↓	Usualmente > 50%
Anemia aplásica	↑	No ↓	↑ (Variable, puede ser 70%)
Hemocromatosis	↑↑	↓	Variable, 80-100% frecuentemente

Hierro sérico en hepatopatías

El hígado contiene alrededor del 30-40% del hierro de reserva. En casos de hepatitis infecciosa o tóxica, en algún momento de su evolución, más del 90% de los enfermos poseen cifras de FeS superiores a 180-200 µg/dl; este ascenso se aprecia a partir de la segunda semana y al parecer se debe a que al destruirse el hepatocito se libera el Fe que contiene y pasa a la circulación.

En raros casos de hepatitis, que no cursan con hiperferremia, hay que pensar en la coexistencia de padecimientos que se acompañan con hipoferremia. En la cirrosis, si hay sangrado hay hipoferremia, pero si se encuentra en fase necrotizante, en donde hay destrucción celular importante, se eleva por la misma razón que en la hepatitis.

TINCIÓN DE HIERRO EN MÉDULA ÓSEA

(Método de Mac Fadzean y Davis, modificado por el Laboratorio de Metodología del Hospital Nacional de la Nutrición, México; con algunas modificaciones efectuadas en el Laboratorio de Estudios Especializados e Investigación (LEEI) del Hospital Nacional de Niños, Costa Rica).

Fundamento

La tinción se basa en la conocida reacción del azul de Prusia, la cual depende de la combinación de hierro inorgánico con ferrocianuro de potasio en solución ácida, para dar ferrocianuro férrico (azul de Prusia).

Reactivos de reserva

- Ferrocianuro de potasio (K_3FeCN_6) al 20%.
- HCl concentrado.
- Fucsina básica al 0,5% (disolución acuosa).
- Rojo neutro al 1% (disolución acuosa).

Reactivos de trabajo

- 1) Se agregan aproximadamente 10 ml de HCl concentrado gota a gota a 40 ml de K_3FeCN_6 , hasta que aparezca un ligero precipitado; luego se filtra.
- 2) En el LEEI se recomienda utilizar una mezcla a partes iguales de K_3FeCN_6 al 2% y HCl 0.2 N, la cual se agrega a los frotis después de fijarlos por tres minutos con metanol. Más adelante se describe el procedimiento modificado.

Mezcla de contratinción

- Se mezcla 1,5 ml de fucsina básica (o 0,20 ml) con 3 ml (o 0,40 ml) de rojo neutro. Se lleva a volumen final de 100 ml (o 12,5 ml) con agua libre de Fe.

Procedimiento

- Las láminas se fijan con formaldehído-citrato-acetona (que esté entre 18 y 26 °C) por 30 segundos y se lavan por 30 a 60 segundos en agua destilada.
- Lavar con agua del tubo y secar a temperatura ambiente.
- Cubrir las láminas con la mezcla de K_3FeCN_6 y HCl (previamente filtrado), durante 30 minutos.
- Lavar con abundante agua del tubo y secar.
- Contratincionar 3-5 minutos con la mezcla de fucsina y rojo neutro; lavar con agua del tubo y secar.

Procedimiento modificado para tinción de hemosiderina

(Método de Mac Fadzeany Davis modificado en LEEI, Hospital Nacional de Niños-CCSS)

Este método modificado, además de ser un procedimiento sencillo, rápido, reproducible y con reactivos fácilmente preparables, da excelentes resultados.

Reactivos de trabajo

- a) Ferrocianuro de potasio al 2%.

Ferrocianuro de potasio (K_3FeCN_6): 2 g.
 Agua destilada csp.: 100 ml.

- b) Ácido clorhídrico 0.2 N.
- c) Eosina en solución acuosa al 0,1%.
- d) Metanol.

Disolución de trabajo (se prepara al momento del uso)*:

- Ferrocianuro de potasio al 2%: 10 ml.
- HCl 0.2 N: 10 ml.

* Esta mezcla es la misma que se utiliza para hemosiderina en orina y en jugo gástrico.

Método

1. Preparar frotis de sangre o médula ósea.
2. Se aconseja hacer dos frotis medulares más gruesos, depositando la muestra e inclinando el portaobjetos sobre una toalla de papel, para que fluya la sangre en exceso y no haya coágulo en el extendido, ya que esto dificulta el proceso. Las espículas de trama medular quedarán esparcidas en el portaobjetos.
3. Secar al aire.
4. Fijar en metanol por tres minutos.
5. Secar al aire.
6. Cubrir los frotis con la disolución de trabajo fresca y dejar 30 minutos.
7. Lavar con agua del tubo y secar.
8. Contratincionar con eosina* 0,1% por tres minutos.
9. Lavar y secar.
10. Alternativamente, podría contratincionarse con algún derivado de Romanowsky.
11. Observar al microscopio.

* También se puede emplear la mezcla de contratinción de fucsina y rojo neutro antes descrita.

Interpretación

- El hierro del sistema monocítico-macrofágico (SMM) se observa a bajo poder (10X) como gránulos de color azul y se reporta en forma semicuantitativa de acuerdo a la normativa internacional: ausente (0); ligeramente disminuido (+); normal (2+); moderadamente aumentado (3+); y marcadamente aumentado (4+).
- Aquella porción del frotis de médula ósea en donde las células se observan bien separadas, es la más indicada para la identificación de los sideroblastos.
- Los sideroblastos son aquellos eritroblastos que poseen gránulos de Fe teñibles. Normalmente un 30-40% de los eritroblastos contienen de uno a tres

gránulos por célula. Estos eritroblastos tienen hierro (como ferritina) disperso en el citoplasma o en siderosomas, que son paquetitos de ferritina, envueltos en una membrana lisosomal. Los eritrocitos que contienen siderosomas se llaman siderocitos. El hierro se evidencia por medio de la reacción de azul de Prusia.

- Los cuerpos de Pappenheimer son siderosomas anormales que contienen hierro y una matriz proteica; dan positiva la reacción de azul de Prusia y se tiñen con Wright; se observan como gránulos pequeños, únicos o en grupos de dos a cuatro, en la periferia de los eritrocitos. Para confirmar su presencia se necesita la reacción de azul de Prusia. Se pueden observar en talasemias, anemias sideroblásticas, megaloblásticas, hemolíticas y en pacientes post-esplenectomizados.
- Los sideroblastos anulares siempre son patológicos; las alteraciones en la síntesis de la Hb, sobre todo del hem (anemias sideroblásticas, intoxicación por plomo, uso de isoniazida, cloranfenicol, alcohol), y rara vez de la globina (talasemias), favorecen la acumulación del hierro dentro de las crestas mitocondriales, formando grandes inclusiones patológicas, que conllevan a una disfunción mitocondrial. Y como las mitocondrias se localizan preferentemente cerca del núcleo, originan los sideroblastos anulares. Para ser catalogados como tales, debe haber más de cinco gránulos lisosomales en un 50% de la circunferencia del núcleo.
- En la anemia ferropriva, tanto el hierro eritroblástico como el reticuloendotelial se encuentran disminuidos o ausentes.
- En la anemia de la enfermedad crónica, el hierro de los eritroblastos está disminuido o ausente, pero aumentado en SMM.
- En patologías que cursan con alteraciones en la síntesis del hem, el hierro en los sideroblastos está muy aumentado.
- En la sobrecarga de hierro (hemosiderosis y especialmente en la hemocromatosis) y en anemia sideroblástica, el hierro del retículo está muy aumentado y se puede observar como grandes masas azules. De igual manera, el hierro eritroblástico se encuentra muy aumentado cualitativa y cuantitativamente.
- Inclusiones que contienen hierro en sangre periférica por lo general solo se ven en individuos esplenectomizados, aunque también se pueden observar en pacientes con una gran variedad de disturbios en la eritropoyesis.
- En la tinción de hierro en médula ósea se puede presentar contaminación ocasional con hierro exógeno, pero los artefactos se encuentran por arriba o por debajo de las células.

TINCIÓN DE HIERRO EN ORINA O EN ASPIRADO GÁSTRICO

(Modificado en el LEEI)

Procedimiento

- Homogenizar la orina o el jugo gástrico y centrifugar 10 ml por cinco minutos a 2.000 rpm.
- Eliminar el sobrenadante y dejar solo un pequeño volumen para resuspender el sedimento.
- En el caso del jugo gástrico, el sobrenadante debe sacarse cuidadosamente con pipeta Pasteur, por ser muy viscoso.
- Añadir un volumen igual a la mezcla de ferrocianuro de potasio al 2% y HCl 0.2 N (la misma utilizada para hemosiderina en el método del LEEI), dividido en partes iguales, y mezclar.
- Dejar a temperatura ambiente por 30 minutos; agitar una vez durante este intervalo.
- Centrifugar por cinco minutos a 2.000 rpm; eliminar con cuidado el sobrenadante y colocar una gota del sedimento en portaobjetos para observar al microscopio.

Cabe mencionar que este método requiere cristalería libre de hierro, incluyendo el recipiente donde se colecta la orina o el jugo gástrico.

Cuando la hemosiderinuria es conspicua o el jugo gástrico presenta siderocitos (hemosiderosis pulmonar), se puede observar el color azul en el propio tubo de ensayo, por lo que el examen microscópico puede ser innecesario. La hemosiderina en orina o jugo gástrico se puede ver como gránulos azules intraepiteliales. En condiciones como la hemoglobinuria paroxística nocturna, la hemosiderina está casi siempre presente y es de gran valor para el diagnóstico.

FERRITINA SÉRICA

Es el examen más útil para valorar los depósitos de hierro. Valores < 12 µg/dl indican ausencia de hierro en depósitos. Una ferritina normal se puede observar no solo en personas con depósitos normales de hierro, sino también en las anemias de los desórdenes crónicos, como consecuencia de un incremento en su síntesis. Para la determinación de la ferritina sérica, se puede contar con métodos de ELISA o inmunoradiométricos.

Se ha visto que la concentración de ferritina sérica correlaciona muy estrechamente con los depósitos de hierro del organismo; por lo tanto, su determinación es un método seguro para evaluar los depósitos de este elemento. La ferritina se encuentra en altas concentra-

ciones en hígado, bazo y médula ósea; sin embargo, se ha encontrado en casi todos los tejidos sólidos del cuerpo.

La ferritina tiene dos papeles fundamentales en el metabolismo del hierro:

- Previene la acumulación de altas concentraciones de hierro libre dentro de las células, secuestrando este en forma inofensiva dentro de la apoferritina.
- En caso necesario, suple el hierro para la síntesis de hemoglobina (deficiencia de hierro).

Método ELISA para determinación de ferritina sérica

(Juego de reactivos prototipo)

Fundamento

Esta prueba consiste en un inmunoensayo enzimático tipo "sándwich" en fase sólida (ELISA: *enzyme-linked immunosorbent assay*), que utiliza anticuerpo anti-ferritina de conejo fijado en la microplaca y anticuerpo monoclonal anti-ferritina de ratón en una solución de conjugado con enzima peroxidasa. La muestra reacciona simultáneamente con ambos anticuerpos. Luego de 45 minutos de incubación a temperatura ambiente, los pocillos de la microplaca deben ser lavados con agua para remover el exceso de anticuerpos. Luego, se adiciona una solución de 3,3', 5,5' tetrametilbencidina (TMB) y se procede a incubar por 20 minutos a temperatura ambiente, dando el desarrollo de una coloración azul, el cual se detiene al adicionar la solución "Stop"; entonces, el color cambia a amarillo. Se realiza la medición en un lector de ELISA a 450 nm.

Materiales y reactivos

- Microplaca de 96 pocillos con anticuerpos anti-ferritina.
- Conjugado anticuerpo anti-ferritina y enzima.
- Patrones de referencia de ferritina de concentraciones: 0, 15, 80, 250, 500 y 1.000 ng/ml.
- Tetrametilbenzidina (TMB).
- Solución "Stop".
- Agua destilada.
- Agitador de placas para VDRL.
- Lector de microplacas de ELISA.

Procedimiento

1. Agregar 20 µl de suero o patrón y 100 µl de reactivo conjugado en el pocillo correspondiente de la microplaca. Agitar por 30 segundos en un agitador

para placas de VDRL. Incubar por 45 minutos a temperatura ambiente.

2. Realizar de cinco a siete lavados con agua destilada para eliminar los anticuerpos no enlazados.
3. Agregar 100 µl del reactivo TMB. Agitar por cinco segundos e incubar 20 minutos en oscuridad (se obtiene coloración azul en los pocillos).
4. Detener reacción con 100 µl de solución "Stop" (cambio de color de azul a amarillo en los pocillos).
5. Agitar por cinco segundos y leer la microplaca a 450 nm antes de que transcurran 15 minutos.
6. Hacer un gráfico, absorbancia versus concentración, basado en los valores de los patrones.

Valores de referencia (interpretación)

La concentración de ferritina es directamente proporcional a la intensidad de color en la muestra.

Los valores de referencia según método descrito por el *International Immuno Diagnostics* son:

- Varones: 28-397 ng/mL.
- Mujeres: 12-160 ng/mL.

PROTOPORFIRINA ERITROCÍTICA UNIDA A ZINC (PE-Zn)

La etapa final en la síntesis del heme es la incorporación de hierro en la protoporfirina IX, por medio de la ferroquelatasa. En la deficiencia de hierro, la síntesis del heme es incompleta por falta de sustrato, y un exceso relativo de protoporfirina se acumula en el eritrocito; en este caso, algunos iones de zinc ocupan el lugar del hierro en dicha molécula y el producto resultante se combina con la globina, originando una pequeña fracción de Hb ($<10^{-3}$) fluorescente, a diferencia de la Hb normal que carece de esta propiedad. Lo anterior permite la detección de la protoporfirina por medio de fluorometría, análisis muy usado actualmente en la investigación de la deficiencia de hierro, ya que esta sustancia se incrementa cuando las reservas de hierro medulares están exhaustas, pero antes de que se manifieste la anemia, microcitosis e hipocromía. También es un método excelente para escrutinio de intoxicación por plomo. Como se infiere, no es un método específico para detectar ferropenia.

Procedimiento para el análisis de PE-Zn (lectura directa en un hematofluorómetro)

- Se oxigenan bien 0,05 ml de sangre anticoagulada con EDTA o heparina.
- Se lee una alícuota en el hematofluorómetro, el cual da el resultado en µg/gHb en menos de 30 segundos.

Valores de referencia normales: $< 3 \mu\text{g/gHb}$.

Deficiencia de hierro o intoxicación por Pb: $>3,5 \mu\text{g/gHb}$.

RECEPTOR SOLUBLE DE TRANSFERRINA (RsTf)

El receptor de transferrina (RTf) es una proteína de transmembrana presente en todas las células del cuerpo, que facilita la toma y el transporte interno de hierro unido a la Tf circulante. El contenido celular de RTF varía con las necesidades de hierro de los tejidos y por eso, es alto en la placenta humana y en los eritroblastos.

Los RsTF son fragmentos truncados de los RTF de las células. Estudios clínicos han demostrado que la concentración de RsTF en suero es proporcional a la masa total de RTF de los tejidos, 80% de los cuales están en los eritroblastos de adultos normales. Se ha confirmado que en cuanto se reduce el suministro de hierro al organismo, se incrementa en gran medida la síntesis de RTF en los eritroblastos y, por tanto, los niveles séricos de RsTF. Lo anterior no sucede en los procesos infecciosos o inflamatorios crónicos. De ahí la especificidad y confiabilidad de esta técnica, en comparación con las pruebas de FeS, CTFFe e IS, con las cuales en ocasiones no es fácil hacer el diagnóstico diferencial entre estas patologías. Además, se sabe que el FeS, CTFFe, IS y la ferritina se modifican considerablemente en respuestas de fase aguda.

Método ELISA para determinación de RsTF

(Juego de reactivos prototipo)

Fundamento

Esta prueba consiste en un inmunoensayo enzimático no competitivo, tipo "sándwich" en fase sólida (ELISA). Las muestras o patrones primero reaccionan con el anticuerpo monoclonal anti- RsTF que recubre la microplaca. En un segundo paso se agrega el conjugado enzima (fosfatasa alcalina)-anticuerpo. Posterior a las incubaciones y lavados (alrededor de dos horas) se realiza la lectura a 405 nm, en un lector de microplacas, y la cantidad de anticuerpo unido es directamente proporcional a la concentración de RsTF.

Materiales y reactivos

- Microplaca de 96 pocillos recubiertos con anticuerpo monoclonal anti- RsTF de ratón.
- Patrones de RsTF.
- Controles de RsTF.
- Conjugado enzima-anticuerpo monoclonal anti-RsTF de ratón.

- Tampón de ensayo.
- Sustrato.
- Tampón sustrato.
- Solución "stop" (corrosiva).
- Solución de lavado.
- Diluyente de muestra.
- Agua destilada.
- Agitador de placas para VDRL.
- Lector de microplacas de ELISA.

Procedimiento

1. Agregar 20 µl de suero, control o patrón y 200 µl del tampón de ensayo en el pocillo correspondiente de la microplaca. Incubar por 45 minutos a temperatura ambiente en un agitador para placas de VDRL a alta velocidad.
2. Lavar cuatro veces la microplaca con 300-450 µl de disolución de lavado previamente diluida.
3. Agregar 200 µl de conjugado previamente diluido. Incubar una hora a temperatura ambiente sobre un agitador para placas de VDRL, a alta velocidad.
4. Lavar cuatro veces la microplaca con 300-450 µl de disolución de lavado previamente diluida.
5. Agregar 200 µl de solución de sustrato previamente diluida. Incubar 30 minutos a temperatura ambiente. No agitar.
6. Agregar 50 µl de solución "Stop" para detener la reacción.
7. Agitar 1-2 minutos sobre un agitador para placas de VDRL, a alta velocidad.
8. Leer absorbancia a 405 nm.
9. Realizar un gráfico, absorbancia versus concentración, basado en los valores de los patrones.

Nota: si la muestra es lipémica, realizar dilución 1:10 con el diluyente de muestra.

Interpretación

La cantidad de anticuerpo unido es directamente proporcional a la concentración de RsTF en la muestra.

Valores de referencia según método descrito de Orion Diagnóstica: 1,3-3,3 mg/dl.

Utilidad práctica de la determinación del RsTF

La determinación del RsTF resulta de gran utilidad para:

- Diferenciar anemia por deficiencia de hierro de las anemias por enfermedad crónica.
- Detectar depleción de hierro, independientemente de los procesos inflamatorios.
- Detectar deficiencia de hierro en casos de res-

puesta de fase aguda en ancianos, niños, pacientes con artritis reumatoide, entre otros.

- Detectar estados subclínicos de deficiencia de hierro, poniendo de manifiesto una eritropoyesis deficiente en hierro.
- Dar seguimiento al tratamiento con eritropoyetina.

HEMOGLOBINA RETICULOCITARIA

La medición del contenido de Hb en el reticulocito es una prueba directa de la incorporación del hierro dentro de la Hb eritrocitaria y, por tanto, un estimado directo de la funcionalidad disponible de hierro dentro del eritrón. La Hb reticulocitaria es un marcador confiable del contenido de Hb celular y puede ser utilizado para identificar las diferentes fases de la deficiencia de hierro.

A través de la medida directa del contenido de Hb en los precursores de los glóbulos rojos (reticulocitos), pueden ser identificadas etapas tempranas de la deficiencia de hierro, en un tiempo en el que otros parámetros bioquímicos tradicionales no son informativos aún.

Los instrumentos automatizados de citometría de flujo y las tinciones fluorescentes para hematología pueden ofrecer, como nuevo método para el diagnóstico de la deficiencia de hierro, un análisis del contenido de la Hb dentro de los reticulocitos. Como estos reflejan la actividad eritroide de la médula ósea, la medida de los índices reticulocitarios puede resultar en un valor predictivo en la evaluación de anemia. Estudios experimentales han demostrado que la medida del tamaño de los reticulocitos es un indicador sensible de la eritropoyesis deficiente de hierro. Este parámetro parece ser un indicador temprano de la deficiencia de hierro, aunque algunos consideran que el volumen reticulocitario no tiene ninguna ventaja importante sobre los otros métodos para establecer un diagnóstico de deficiencia de hierro.

HEPCIDINA

Nuestro entendimiento del control molecular del metabolismo del hierro ha incrementado dramáticamente en los últimos años, luego del descubrimiento de la hormona reguladora del hierro, denominada hepcidina.

La hepcidina actúa uniendo moléculas de ferroportina asociadas a membrana celular, que son los únicos conductos para la exportación del hierro, e induciendo la internalización y la degradación de la ferroportina.

Defectos genéticos que causen deficiencia de hepcidina conllevan a una sobrecarga de hierro similar a la hemocromatosis; esto se ha visto en ratones "knockout".

Contrario a esto, mientras más alta es la concentración de hepcidina, menos ferroportina se encuentra disponible para la exportación de hierro y, por tanto, decrece la liberación de hierro desde los macrófagos, los hepatocitos y los enterocitos. Por ejemplo, en sujetos con adenomas hepáticos grandes se ha encontrado sobreexpresión de hepcidina, presentando estas personas una anemia microcítica severa refractaria al hierro, la cual se corrige al remover el adenoma.

Se ha demostrado que la hepcidina es un reactante de fase aguda, incrementado por interleucina IL-6 y marcadamente inducido por infección e inflamación. Investigaciones han puesto de manifiesto que la expresión de hepcidina se incrementa por el lipopolisacárido presente en bacterias, lo cual induce la producción de proteínas de fase aguda en respuesta a infección o inflamación.

El LEAP-1 (*liver-expressed antimicrobial protein*), como originalmente se le llamó a la hepcidina, fue identificado por primera vez en sangre humana utilizando espectrometría de masas. Tiempo después se aisló hepcidina-20 y hepcidina-25 de orina humana mediante HPLC (*high performance liquid chromatography*/ cromatografía líquida de alta eficacia) y cromatografía de intercambio iónico. Estos trabajos sugieren que la prohepcidina se origina en hígado (detectada vía expresión ARNm) y luego de su procesamiento, los pequeños péptidos de hepcidina llegan al riñón a través del plasma, donde son detectados como las formas de 20 y 25 aminoácidos.

Considerando, entre otras cosas, que en la actualidad no hay consenso sobre cuál es el mejor método para la determinación de la hepcidina, se considera necesario que se realicen investigaciones sobre el control molecular de esta hormona, su farmacodinámica y fisiología, para poder desarrollar un test de laboratorio confiable, el cual podría tener una utilidad clínica potencial en el diagnóstico y en la clasificación de desórdenes en el almacenamiento del hierro, como lo son la hemocromatosis hereditaria, la anemia por deficiencia de hierro y la anemia de la enfermedad crónica.

Además, el desarrollo de análogos de hepcidina podría tener futuras aplicaciones terapéuticas. A modo de ejemplificación, un agonista de la hepcidina podría ser útil en el manejo de pacientes con hemocromatosis hereditaria, aunque la mayoría de estas personas están bien controladas por programas de sangrías terapéuticas.

BIBLIOGRAFÍA

Del Castillo A, De Portugal J. Hepcidina, una nueva proteína en la homeostasis del hierro. *An Med Interna (Madrid)* 2003; 20(12): 605-606.

Gkouvatsos K, Papanikolaou G, Pantopoulos K. Regulation of iron transport and the role of transferrin. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1820(3): 188-202.

Gulec S, Anderson GJ, Collins JF. Mechanistic and regulatory aspects of intestinal iron absorption. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2014; 307(4): G397-G409.

Kroot JJ, Laarakkers CMM, Geurts-Moespot AJ, Grebenchtchikov N, Pickkers P, van Ede AE, *et al.* Immunochemical and mass-spectrometry-based serum hepcidin assays for iron metabolism disorders. *Clin Chem* 2010; 56(10): 1570-1579.

Kroot JJ, Tjalsma H, Fleming RE, Swinkels DW. Hepcidin in human iron disorders: diagnostic implications. *clinical chemistry* 2011; 57(12): 1650-1669.

Lichtman M, Beutler E, Kaushansky K, Kipps TJ, Seligsohn U, Prchal J. *Williams Hematology*. 7 ed. New York: McGraw-Hill Professional; 2005.

Loría A, Monge B. Técnicas de dosificación séricas de hierro y capacidad de fijación de hierro. *Rev Inv Clin (México)* 1966; 19: 17-18.

Mora LA, Boza S. Métodos de escrutinio del metabolismo del hierro. En: Sáenz GF (editor). *Hematología analítica*. Tomo II. 5 ed. San José, Costa Rica: EDNASSS; 2008. p. 599-607.

Mora LA, Jiménez E. Metabolismo del hierro y anemia por deficiencia de hierro. En: Sáenz GF (editor). *Hematología analítica*. Tomo I. 5 ed. San José, Costa Rica: EDNASSS; 2008. p. 83-93.

Nemeth E, Ganz T. Regulation of iron metabolism by hepcidin. *Annu Rev Nutr* 2006; 26: 323-342.

Wang W, Knovich MA, Coffman LG, Torti FM, Torti SV. Serum ferritin: past, present and future. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1800(8): 760-769.

Wollmanna M, Cerezer BM, Schwert V, Weber R, de Oliveira G. Reticulocyte maturity indices in iron deficiency anemia. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2014; 36(1): 25-28.

MÉTODOS PARA LA DETECCIÓN DE ERITROENZIMOPATÍAS

*Dra. Sandra M. Boza Oreamuno
Dr. Walter E. Rodríguez Romero
Dr. German F. Sáenz Renauld*

INTRODUCCIÓN

Las eritroenzimopatías son deficiencias enzimáticas que por lo general causan anemias hemolíticas en el paciente. En el glóbulo rojo las más frecuentes son: la deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), un desorden ligado al cromosoma X; el déficit de piruvato quinasa (PK); y, finalmente, la alteración de pirimidina 5' nucleotidasa (P5'N). Todas estas son heredadas como desórdenes autosómicos recesivos.

Para poder entender las alteraciones causadas por dichas eritroenzimopatías, es necesario conocer el metabolismo de la glucosa en el eritrocito. La glucosa es la fuente de energía normal en el glóbulo rojo; esta es metabolizada por el eritrocito entre dos rutas mayores, la vía glicolítica y la vía del shunt de las pentosas (Figura N° 1).

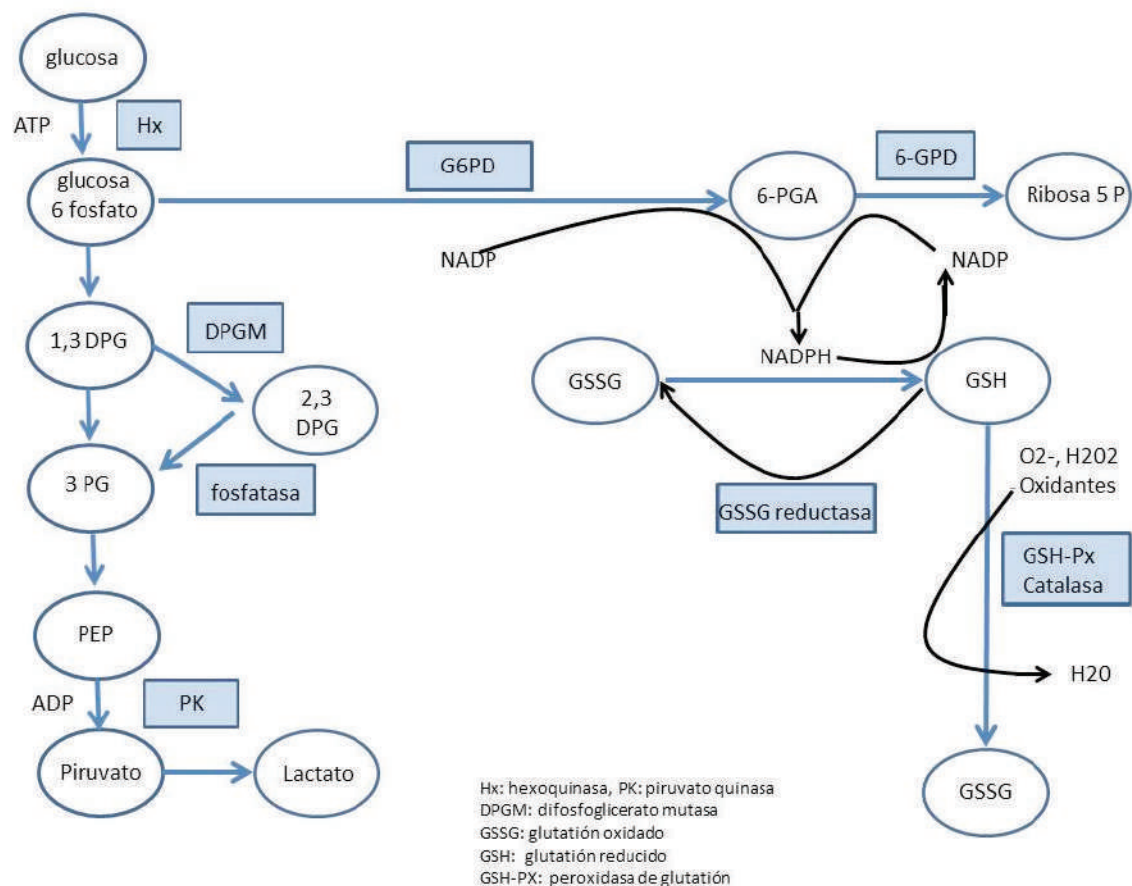
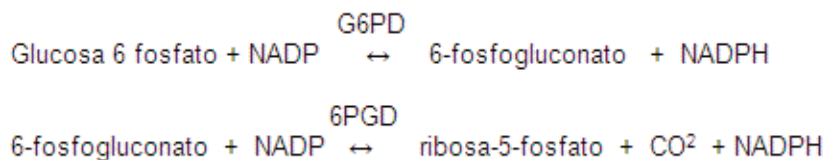


Figura N° 1. Metabolismo de la glucosa en el eritrocito.

GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA (G6PD)

Bajo condiciones normales, cerca del 90-95% de la glucosa utilizada por los eritrocitos maduros se metaboliza mediante la glicólisis anaeróbica o ciclo de Embden-Meyerhof; mientras que entre el 5% y el 10% lo hace por medio de la vía catalítica conocida como

ciclo oxidativo de las pentosas fosforadas o shunt de las pentosas, cuya función consiste en mantener de forma reducida al glutatión, un agente detoxificante celular clave en el control del daño oxidativo en el eritrocito. Este ciclo genera la forma reducida de la nicotinamida adenina-dinucleótido fosfato (el NADPH) como producto de la acción de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) y la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGD):



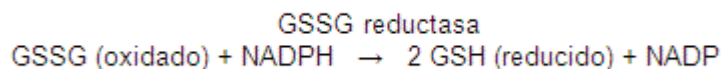
Cabe señalar que la G6PD es una enzima metabólicamente importante en el eritrocito, y cataliza el primer paso de la vía del shunt de las pentosas, que suple NADPH para los mecanismos de defensa antioxidante.

Las reacciones más importantes asociadas con la reducción del NADP son las que se relacionan con el metabolismo del glutatión, el cual, como se indicó, protege al glóbulo rojo contra daños producidos por oxidantes endógenos o exógenos; por ello, en los eritrocitos la mayoría del NADPH es utilizado en la reacción de la glutatión reductasa, la cual genera glutatión reducido, que es oxidado en la reparación de

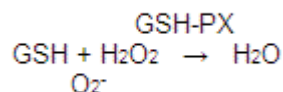
daño oxidativo.

En las células nucleadas existe una función adicional, que consiste en proveer ribosa-5-fosfato para la síntesis de ácidos nucleicos. Otro proceso aplicado en la reducción de la metahemoglobina y que solo entra en funcionamiento en estados de emergencia, es el mediado por los acarreadores artificiales de electrones, como el azul de metileno, de amplia aplicación clínica en metahemoglobinemias.

Como se detalla a continuación, el glutatión se mantiene reducido mediante la presencia de NADPH + H⁺ y la glutatión reductasa:



Su actividad detoxificante se efectúa a través de su interacción con la peroxidasa:



Estructura

El gen estructural del G6PD se localiza en la región telomérica del brazo largo del cromosoma X (banda Xq28), cerca de los genes codificantes para la hemofilia A (deficiencia del factor VIII de la coagulación), la disqueratosis congénita y el daltonismo. Este gen, clonado en el año 1986, consta de 13 exones y 12 intrones; contiene 515 aminoácidos y una región promotora rica en guanina y citosina (GC, más del 70%). La enzima es activa en forma de tetrámero o de

dímero. Cada monómero tiene un peso cercano a los 59 kDa y posee dos dominios unidos a través de un enlace α-hélice.

Deficiencia de G6PD

La deficiencia de G6PD es la eritroenzimopatía congénita más frecuente en el mundo; fue descubierta en 1956, cuando se estaban estudiando las razones por las cuales un grupo de soldados americanos desarrollaron anemia hemolítica aguda luego de la

ingesta de drogas antimaláricas. Dos años después, se determinó que dicha deficiencia estaba ligada al sexo.

Según la hipótesis de Lyon, solo un cromosoma X es activo en cualquier célula somática. De esta forma, los varones son hemicigotos para la deficiencia (X^Y), mientras que las mujeres pueden ser tanto homocigotas (X^X) como heterocigotas (X^X); estas últimas presentan un espectro muy variable de su expresión fenotípica.

Los padres varones deficientes de la enzima no transmiten el trastorno a los hijos, pero sí a las hijas. Sin embargo, el trastorno rara vez se observa en mujeres, porque la situación homocigota (X^X) significa herencia de un gen mutante proveniente de cada progenitor, lo cual no es común. En la mujer afectada que usualmente es heterocigota (X^X), por lo general hay una expresión parcial del carácter.

Cabe mencionar que la enzima G6PD está presente en todas las células; no obstante, su concentración varía en los diferentes tejidos, siendo crucial su presencia dentro del glóbulo rojo, por lo ya descrito en el metabolismo eritrocitario. Poco menos de 400 millones de personas distribuidas en todo el mundo presenta una mutación a nivel del gen codificante para la G6PD. La más alta prevalencia de esta eritroenzimopatía es reportada en África, Asia y región Mediterránea, al igual que en el Medio Este y en el sur de Europa. También se reportan casos en el Norte y Sur de América, así como en los países del norte de Europa.

Con respecto a Costa Rica, Sáenz y colaboradores reportaron para este país un 14,6% de deficiencia de G6PD en Limón (raza afrodescendiente), un 4% en Guanacaste (mezclas entre raza afrocaribeña y otras) y menos del 1% en caucásicos. Además, reportaron los siguientes valores en niños (hemisigotos) escolares costarricenses: raza negra: 6,6%; mestiza: 1,4% y caucásica: 0,75%.

La amplia distribución mundial de la malaria (en especial la transmitida por *Plasmodium falciparum*) es muy similar a la de la deficiencia de G6PD, lo que deja en evidencia que esta última confiere una relativa protección o resistencia contra la malaria. Dos aparentes excepciones a esta evidencia geográfica son el sur de Europa y Norteamérica, por las siguientes razones: la malaria fue erradicada en el sur de Europa durante el siglo XX, y en el norte de América, el defecto es atribuido a los inmigrantes y descendientes de estos inmigrantes provenientes de regiones donde la malaria es endémica. El mecanismo exacto por el cual esta deficiencia ofrece protección es aún

incierto; sin embargo, es bien aceptado que el estrés oxidativo ocasionado por la infección en los eritrocitos enzimáticamente deficientes, genera degradación de hemoglobina, oxidación de membranas y cambios en la fluidez de la membrana, lo que lleva a la fagocitosis de estos glóbulos rojos, reduciendo así el riesgo de una infección severa.

Aunque la pérdida completa de esta enzima es presuntamente letal, son comunes diversas formas mutantes de G6PD con deficiencia parcial de la actividad. Dicha deficiencia puede deberse a una reducción en el número de moléculas enzimáticas, a una diferencia estructural en la enzima que genera un cambio cualitativo de esta, o ambos. A la fecha, se han reportado alrededor de 160 variantes moleculares, de las cuales la mayoría son de una única sustitución de base, llevando a un reemplazo de aminoácido. En el sitio web <http://202.120.189.88/mutdb/> se pueden encontrar casi todas las mutaciones identificadas en el gen que codifica para la enzima. Estas variantes pueden ser clasificadas como esporádicas o polimórficas, siendo las primeras las menos frecuentes. Gracias al estudio del ADN, se ha observado que muchas de las variantes presentan una misma mutación en el genoma.

Estudios electroforéticos de la enzima parcialmente purificada han demostrado dos variantes o isoenzimas de la G6PD en personas normales. En caucásicos, la enzima aparece como una banda simple denominada Gd^B^+ (y su contraparte deficitaria como Gd^B^-). La otra, electroforéticamente más anódica, es la que se encuentra en la población afrodescendiente y se conoce como Gd^A^+ (su contrapartida anormal es la Gd^A^-).

En la mayoría de las áreas con prevalencia alta de deficiencia de G6PD, existen diversas variantes con mutaciones, a excepción de África, donde el 90% de las mutaciones son dadas por la variante designada como G6PD A-. Esta variante también es frecuente en el norte y sur de América, y en áreas donde residen personas de origen africano. Una prevalencia un poco más baja está presente en Italia, Islas Canarias, España, Portugal y Medio Oeste. La segunda variante más común es la G6PD Mediterránea, la cual se encuentra en todos los países que circundan el mar Mediterráneo; además, se ha expandido en el Este Medio. Otras variantes son la G6PD Seattle y G6PD Union, las cuales se han reportado en el sur de Italia, Grecia y Alemania. La G6PD Union también ha sido reportada en China.

En Costa Rica se han encontrado tres variantes nuevas y únicas en el mundo: la Gd San José, la Gd^B^- Puerto Limón y la Gd^B^- Santamaría; todas originan anemia

hemolítica crónica no esferocítica (ACHNE) y crisis durante estrés oxidativo.

Hasta el momento, en el mundo se han caracterizado más de 400 variantes bioquímicas; lo que varía entre ellas son sus propiedades físicas, el pH óptimo, la constante de Michaelis-Menten (K_m), su termoestabilidad y su afinidad por otros sustratos, como la 2 desoxiglucosa 6-fosfato.

Cada una de esas variantes puede ser clasificada también según su actividad enzimática residual y los síntomas asociados; de acuerdo con esto, la Organización Mundial de la Salud (OMS) las ha agrupado en cinco clases:

- Clase I: incluye variantes con deficiencia enzimática severa, asociadas con anemia hemolítica crónica no esferocítica (ACHNE).
- Clase II: estas variantes se relacionan con deficiencia severa (1-10% de actividad residual), pero no asociadas con AHCNE, sino más bien con anemia hemolítica aguda. Dentro de esta categoría se incluyen las variantes G6PD Mediterránea y la G6PD Oriental.
- Clase III: estas variantes presentan una moderada deficiencia enzimática (10-60% de actividad residual). Aquí se incluyen las variantes Africanas G6PD A- y G6PD A+.
- Clase IV: actividad normal (60-150%).
- Clase V: actividad incrementada (más de 150%).

Presentación clínica de la deficiencia de G6PD

Afortunadamente, la mayoría de individuos deficientes de G6PD son asintomáticos a lo largo de la vida; sin embargo, esto repercute en que muchos de ellos ni siquiera tienen idea de su estado enzimático deficiente.

La ictericia neonatal, la anemia hemolítica aguda (AHA) y la anemia hemolítica crónica, son las manifestaciones clínicas más comunes, las cuales, en la mayoría de pacientes, son detonadas por un agente externo.

Ictericia neonatal

En los neonatos deficientes de G6PD, el riesgo de desarrollar ictericia neonatal es mayor que en neonatos con una actividad enzimática normal. Varias investigaciones han reportado que de los neonatos del sexo masculino que presentan ictericia, un tercio de ellos presenta deficiencia de la enzima. La ictericia suele ser evidente entre el primer y el cuarto día de nacido, similar a la ictericia fisiológica.

La estrecha relación entre la deficiencia enzimática y la presencia de ictericia varía ampliamente en

su frecuencia y severidad dentro de las diferentes poblaciones alrededor del mundo.

El mecanismo y razones por las que esta enzimopatía causa hiperbilirrubinemia neonatal, aún no es del todo comprendida.

Anemia hemolítica aguda (AHA)

Los individuos deficientes de G6PD, pero asintomáticos, tienen riesgo de desarrollar AHA como manifestación de episodios hemolíticos intravasculares, que responden a tres detonantes:

1. **El favismo:** es la anemia hemolítica que ocurre después de la ingesta de frijoles *Vicia fava* en individuos deficientes, quienes también pueden sufrir el estrés al inhalar el polen de esta planta leguminosa. El favismo solo se da en caucásicos (GdB-); sin embargo, no todos ellos sufren de esta patología. La anemia hemolítica del favismo es muy severa y presenta una mortalidad alta, sobre todo en niños.
2. **Infecciones:** en pacientes deficientes de G6PD que sufren alguna enfermedad febril, es común observar episodios de hemólisis espontánea, en ausencia de exposición a drogas. Ciertas infecciones virales, con inclusión de las respiratorias, han sido implicadas en este tipo de hemólisis espontánea.
3. **Drogas:** aquellas que causan hemólisis en individuos deficientes de G6PD, infringen daño oxidativo en los eritrocitos, lo que conlleva a la destrucción de estos. La ingesta de drogas oxidativas por parte de mujeres que amamantan a sus hijos, pueden, a través de la leche materna, detonar una hemólisis aguda en los bebés, si ellos son deficientes de la enzima. Lo mismo puede suceder con la ingesta de frijoles *Vicia fava*.

Luego de la exposición al agente detonante, la crisis hemolítica inicia con malestar, debilidad y dolor abdominal y lumbar; además, el paciente desarrolla ictericia. Presencia de orina oscura debido a la hemoglobinuria, es un signo característico, al igual que la presencia de cuerpos de Heinz en eritrocitos periféricos (detectados por la tinción azul cresil brillante). Esto sucede en un intervalo que va desde unas cuantas horas hasta dos o tres días.

Aparte de esas tres condiciones, se cree que también la acidosis diabética y la hipoglicemia están relacionadas con hemólisis en pacientes con deficiencia de G6PD.

Las variantes que causan este tipo de hemólisis, son mutaciones de origen polimórfico.

Anemia hemolítica crónica no esferocítica (AHCNE)

La forma clínica más severa de la deficiencia de G6PD es aquella encontrada en pacientes que presentan AHCNE. Las variantes que ocasionan este tipo de anemia se agrupan en la clase I (con muy bajos niveles de actividad enzimática) y se deben a mutaciones genéticas de origen esporádico. Estos pacientes, por fortuna, representan una minoría dentro de los individuos deficientes de la enzima.

Este desorden es usualmente sospechoso durante la infancia y su diagnóstico se basa en los hallazgos clínicos. Muchos de estos pacientes tienen historial de ictericia neonatal severa, anemia crónica exacerbada por estrés oxidativo, reticulocitosis, cálculos biliares y esplenomegalia.

A diferencia de la AHA antes descrita, este tipo de hemólisis es sobre todo extravascular, y ocurre durante el metabolismo normal del eritrocito.

También en estos pacientes puede presentarse hemólisis aguda por la administración de drogas que en ciertas dosis son seguras para deficientes con variantes polimórficas (no detonantes de crisis hemolítica).

Diagnóstico de laboratorio

Dada la importancia, en cuanto a frecuencia, de la deficiencia de G6PD, se describen en este capítulo tres métodos visuales de escrutinio: método de la reducción de la metahemoglobina (de Brewer y colaboradores), método de la reducción del azul de metileno (de Sass y Caruso), y la prueba de cianuro ascorbato.

Los métodos específicos que se toman como referencia son: las manchas fluorescentes de Beutler, el método electroforético y la cuantificación cinético-enzimática.

Prueba de la reducción de la metahemoglobina (Brewer et al)

Este es un análisis simple y de fácil realización. Detecta aquellos pacientes que pueden desarrollar hemólisis clínicamente significativa, debida a deficiencia de G6PD, que se puede manifestar cuando ciertas drogas son administradas en condiciones de acidosis metabólica y en procesos infecciosos sistémicos.

Principio

La hemoglobina (color rojo, Fe^{++}) de la muestra es oxidada a metahemoglobina (color café, Fe^{+++}) en presencia de nitrito de sodio. El azul de metileno de la mezcla de reacción estimula el ciclo de las pentosas, y en presencia de G6PD se genera $\text{NADPH} + \text{H}^+$, el cual reduce la metahemoglobina a hemoglobina. Se producirá así en un inicio una variación de color rojo a café, y luego, en presencia G6PD, este se tornará nuevamente rojo.

La cantidad de metahemoglobina remanente después de tres horas de incubación de la sangre con nitrito de sodio y azul de metileno, provee un índice de la generación de NADPH (asumiendo como normal el sistema NADPH-metahemoglobina reductasa). La reducción es completa en sujetos normales, pero en hombres hemicigotos y mujeres homocigotas, entre un 70% y un 95% de la metahemoglobina permanece sin reducirse en las condiciones de la prueba.

En ausencia de la enzima el color café permanece.

Reactivos

- Nitrito de sodio 0,18 M y dextrosa 0,28 M

Glucosa	5,0 g
Nitrito de sodio	1,25 g
Agua destilada c.s.p	100 ml
Solución de azul de metileno	0,0004 M
Cloruro de azul de metileno trihidratado (NE)	0,15 g
Agua destilada c.s.p.	1.000 ml

Anticoagulantes

1. Heparina (100 U/ml de salina).
2. EDTA 0,1 ml de una solución 10% para 5 ml de sangre.
3. Solución ACD mejorada, 6 CPD.

4. Solución de Alsever.

Si no es posible estudiar de inmediato las muestras, estas deben guardarse a 4 °C, bajo las siguientes condiciones:

- Durante 24 horas, la sangre recogida con heparina o EDTA, sin ningún aditivo. en solución de Alsever.
- Durante 96 horas, la sangre recogida con ACD. No se deben utilizar como anticoagulantes el fluoruro de sodio o los oxalatos.
- Durante 14 días, sangre con ACD e inosina o guanosina.
- Durante 25 días, a temperatura ambiente o a 4 °C Solución ACD mejorada (Fórmula No. 2)

Citrato trisódico dihidratado	9,5625 g
Acido cítrico monohidratado	3,0 g
Dextrosa (glucosa anhidra)	4,5 g
Agua destilada c.s.p.	100 ml
pH 5.0	

Se emplean 0,2 ml de la solución anterior para 5 ml de sangre. Si no es posible analizar la sangre dentro de

las 36 horas posteriores a su recolección, debe usarse la solución con las siguientes cantidades de inosina o guanosina:

Inosina	2,45 g
Solución ACD mejorada c.s.p.	100 ml
Guanosina	20 mg/5ml de sangre y 0,2 ml de ACD
Solución de Alsever	
Glucosa	20,5 g
Citrato de sodio	8,0 g
Ácido cítrico	5,5 g
Cloruro de sodio	4,2 g
Agua destilada c.s.p.	1.000 ml

Se esteriliza en autoclave por 15 minutos a 15 libras; se emplean 0,75 ml de la solución para 5 ml de sangre.

Procedimiento

Si se desea, los reactivos para la prueba pueden desecarse en tubos a temperatura ambiente o en estufa a 37 °C (esto último es lo más conveniente). Si se secan en tubos de rosca o viales, los reactivos son estables por seis meses. Si no se desea, los reactivos deben agregarse al tubo de ensayo inmediatamente antes de su uso.

Si la sangre es anémica (menos de 30% de Hto) se centrifuga y se descarta la mitad del plasma (Hto = 40, ± 5%).

Se marcan tres tubos de diámetro similar (10 x 75 mm):

1. Tubo de referencia normal = 1 ml de sangre normal (no adicionar reactivos).
2. Tubo de referencia positivo = 0,05 ml de la solución nitrito de sodio glucosa + 1 ml de sangre del

paciente o normal (no adicionar azul de metileno).

3. Tubo desconocido: 0,05 ml de la solución nitrito de sodio glucosa + 0,05 ml de la solución de azul de metileno + 1,0 ml de sangre del paciente.

Luego de una adecuada mezcla por inversión, se colocan los tubos en un baño de agua o estufa a 37 °C. Sin tapar y sin agitar, a las tres horas se saca del baño y se mezcla por inversión los tubos. En tres tubos de ensayo de 15 x 125 mm, marcados como normal, positivo y desconocido, se colocan 10 ml de agua, se agrega 0,1 ml de sangre recién agitada del tubo respectivo (postincubación) y se observa si hay variación en el color en un tiempo no menor de dos minutos ni mayor de 10 minutos después de la dilución.

Interpretación

- *Tubo de referencia normal:* permanece rojo.
- *Tubo de referencia positivo:* permanece café, debido a que en presencia de nitrito de sodio la hemoglobina es oxidada a metahemoglobina.

- *Tubo desconocido:*

- Persona deficiente: el tubo permanece gris oscuro o café (similar al tubo de referencia positivo).
- Personas normales: tubo con coloración rojo claro, similar al tubo de referencia normal.
- Mujeres deficientes (heterocigotas): el color varía de rojo a café, según la expresión de los genes (Lyon), debido a que se reduce la metahemoglobina a hemoglobina según la cantidad de enzima presente.

En personas deficientes persiste más del 70% de la metahemoglobina formada (coloración café), mientras que en personas normales lo hace menos del 5%.

Comentarios sobre el método

La prueba es positiva en individuos con otras deficiencias enzimáticas (como metahemoglobina reductasa NADPH y NADH- diaforasa), así como en presencia de hemoglobinas inestables (por ejemplo, Kiln, Olmsted, Santa Ana, HbM) y drogas oxidantes.

Clínicamente, esta prueba es útil para descubrir deficientes completos, como el varón hemicigoto o la mujer homocigota. Sin embargo, no es tan sensible como para descubrir mujeres heterocigotas, y muchas veces da resultados equívocos después de un episodio hemolítico agudo, cuando la mayoría de los eritrocitos viejos con valores bajos de G6PD han sufrido lisis. En este caso, la prueba debe repetirse unos meses después, cuando haya predominio de población eritrocítica adulta, ya que la deficiencia de G6PD se acentúa (por degradación) al envejecer el eritrocito (deficiencia de G6PD tipo afrodescendiente (A-)). En este mismo tipo de deficiencia, el reticulocito posee actividad enzimática similar a la de los reticulocitos de individuos normales.

En la deficiencia de G6PD tipo mediterráneo (B-) existe menos diferencia entre la actividad enzimática de reticulocitos y eritrocitos adultos, pues en este caso la síntesis de G6PD se encuentra disminuida en ambos. Así, en las deficiencias del tipo usual en los afrodescendientes, esta prueba y la de Sass y Caruso pueden dar resultados falsamente normales en el curso de los episodios hemolíticos, pues, como ya se expuso, aunque los eritrocitos viejos quedan destruidos, los jóvenes poseen suficiente actividad enzimática como para mantener los resultados dentro de los límites normales. Por el contrario, en las deficiencias del tipo mediterráneo la prueba permitirá descubrir al 80-90% de los enfermos en el curso de esos episodios hemolíticos, obviamente con la condición de que no se practiquen transfusiones.

Método de la reducción del azul de metileno (Método de Sass y Caruso)

Se trata de una reacción coloreada, rápida y simple para uso de rutina en la investigación de escrutinio de la deficiencia de G6PD.

Principio

El azul de metileno estimula el ciclo de las pentosas para que produzca NADPH + H⁺ por acción de la G6PD. El azul de metileno se reduce (pasa a incoloro) en presencia de H⁺. Lo anterior permite detectar pacientes con deficiencia de G6PD, porque en ausencia de la enzima no hay estímulo al desvío de las pentosas, no se genera poder reductor y, por tanto, el azul de metileno no sufre reducción y conserva su color.

Esta prueba debe considerarse como de orientación o de escrutinio, y tiene la ventaja de que, salvo en crisis hemolíticas, no da falsos negativos.

Reactivos

- *Tampón de fosfatos 0,066 M (M/15), pH 7.4*

Na ₂ HPO ₄ 0,066 M	9,46 g/l
KH ₂ PO ₄ 0,066 M	9,08 g/l
Agregar solución de KH ₂ PO ₄ a 500 ml de Na ₂ HPO ₄ hasta obtener un pH de 7.4.	

- *Solución salina-glucosa-tampón de fosfatos*

Glucosa anhidra	1,0 g
NaCl	4,25 g
Tampón de fosfatos 0,066 M	500 ml

- Solución de reserva de azul de metileno (estable por varios meses a 4 °C)

Azul de metileno	0,3
Agua destilada c.s.p.	100 ml

- Solución de trabajo de azul de metileno

Solución de reserva de azul de metileno	1,5 ml
Solución salina-glucosa-tampón de fosfatos c.s.p.	500 ml

Procedimiento

1. En un tubo de ensayo de 12 x 75 mm se colocan 0,4 ml de eritrocitos empacados, los cuales se pueden obtener a partir de sangre sedimentada o centrifugando la muestra a 1.500 g durante tres minutos. La sangre debe obtenerse con los anticoagulantes recomendados en la técnica de Brewer *et al.* Es recomendable efectuar un lavado con solución salina.
2. Se agrega 1,25 ml de la solución de trabajo de azul de metileno y se mezcla bien; se deja a temperatura ambiente por 30 minutos.
3. Después de los 30 minutos de la incubación, se agitan bien nuevamente y se centrifugan a 2.000 g durante cinco minutos.

Interpretación

Los tubos que presentan color azul en el sobrenadante indican prueba positiva (deficiencia de G6PD), mientras que un sobrenadante incoloro representa una prueba negativa (pacientes sin la deficiencia enzimática).

Comentarios

El tiempo de incubación es flexible y no es crítico; 30 minutos representa el período mínimo de incubación, pero se puede extender a 45 o 60 minutos sin alterar la prueba.

La observación del color del sobrenadante por lo general no es difícil. En las muestras positivas su color es equivalente a una dilución a partes iguales del colorante y agua. Los problemas de lectura se pueden presentar en plasmas ictericos o con hemólisis. En esas situaciones se recomienda agregar pequeñas cantidades del colorante a muestras de suero con y sin los pigmentos mencionados.

En todo caso, ante estas circunstancias, es preferible lavar rápidamente los eritrocitos una sola vez con solución salina tamponada, con el fin de eliminar dichos interferentes.

El volumen de eritrocitos es importante, ya que si este es menor al indicado, puede darse falsos positivos.

Prueba del cianuro-ascorbato (Modificación al Método de Jacob y Jandl)

La prueba de cianuro-ascorbato permite detectar el déficit de G6PD, así como de otras enzimas involucradas en la síntesis del glutatión y en la deficiencia de piruvato quinasa (PK), aunque por su frecuencia, una prueba positiva con mucha probabilidad se trata de una deficiencia de G6PD.

Principio

El ascorbato de sodio, agente oxidante, actúa sobre la oxihemoglobina produciendo metahemoglobina y sulfohemoglobina por efecto del H_2O_2 , en tanto la actividad catalasa se ve inhibida por el cianuro de sodio (NaCN). En presencia de G6PD, el desvío de la pentosa es suficiente para prevenir la acumulación de metahemoglobina y sulfohemoglobina, ya que en este ciclo se genera NADPH; este mantiene al glutatión reducido y, por lo tanto, se ejerce su actividad peroxidasa. En ausencia de G6PD se acumulará metahemoglobina y sulfohemoglobina, y aparecerá en el tubo de prueba una coloración marrón, mientras que en presencia de G6PD normal aparecerá un color rojo oscuro (oxihemoglobina).

Reactivos

Anticoagulantes

Debe evitarse el uso de los oxalatos. Utilizar preferiblemente EDTA, CPD, ACD o citrato de Na.

Ascorbato de sodio 0.2 M pH 7.4 (Merck 500076).

- Se afora a 100 ml.

- Se pesan 3,96 g de ascorbato de sodio, se disuelven en H₂O desionizada y se ajusta el pH 7.4.

Si no se cuenta con ascorbato de sodio o este se ha deteriorado, se procede a preparar el ascorbato de sodio 0,2 M de la siguiente manera:

Ácido ascórbico	3,522 g

Se disuelve en 50 ml de agua destilada. Se ajusta el pH a 7.4 con NaOH 0,1 M. Se afora el volumen a 100 ml con agua destilada. Esta solución tiene una estabilidad

máxima de una hora.

Glucosa anhidra 0,2 M (Sigma G-5000)

Glucosa	3,6 g
H ₂ O desionizada c.s.p.	100 ml
Cianuro de sodio 0,1 M	
NaCN	0,49 g
H ₂ O desionizada c.s.p.	100 ml

Se congelan (-10 °C) los reactivos individualizados en viales bien cerrados de 1 ml, los cuales son estables por tiempo indefinido en estas condiciones.

Tampón de glicilglicina pH 7.4 (TGG)

Constituyente

NaCl 1 M	140 ml	140 mM	Concentración final de cada constituyente
KCl 1 m	5 ml	5 mM	
NaH ₂ PO ₄ 1M	1 ml	1 mM	
MgCl ₂ 0.5 M	2.5 ml	1 mM	
Glicilglicina 0,5 M, pH 7.4	40 ml	20 mM	
H ₂ O desionizada cp	1.000 ml		

Para la suspensión pueden emplearse cualquiera de los tampones fisiológicos para eritrocitos (PBS, Tampón-Tris, entre otros).

Procedimiento

- Se lavan los eritrocitos tres veces con cualquier tampón fisiológico para eritrocitos.
- Debe asegurarse que no exista hemoglobina libre (hemólisis), ya que ello conduciría a una reacción falsa positiva.
- Se prepara una suspensión de eritrocitos al 20% en tampón fisiológico.
- Se montan todas las muestras por duplicado, incluyendo una normal, que servirá para llevar el control normal y el deficiente.
- En todo caso, la muestra en estudio puede usarse también para los dos controles que se exigen (Cuadro N° 1).
- Se mezclan bien las muestras por inversión.
- Se tapan los tubos con parafina.
- Se incuban en baño maría a 37 °C.
- Se observa si hay cambio de color entre la 1,2 y las 3 horas (rojo a marrón).
- Se anota el resultado como negativo o positivo en cruces.
- El control negativo se prepara con el objeto de asegurar el buen funcionamiento del ascorbato y del resto del sistema.

Cuadro N° 1. Flujograma para montar prueba cianuro-ascorbato			
Reactivos	Control normal (-)	control deficiente (+)	Pacientes
Suspensión eritrocitos al 20% de persona normal	1 ml	1 ml	----
Suspensión eritrocitos al 20% del paciente	----	----	1 ml
Glucosa 0.2 M Cianuro Na 0.1 M Ascorbato Na 0.2 M	0,05 ml 0,05 ml 0,05 ml	---- 0,05 ml 0,05 ml	0,05 ml 0,05 ml 0,05 ml

Comentarios sobre el método

Tratándose de una simple prueba de escrutinio, solo se necesita el cambio de color. Entre las pruebas de escrutinio para deficiencia de G6PD esta es la más sensible; solo requiere que exista un 20% de células anormales para dar positiva. Cualquier anomalía en la prueba del cianuro-ascorbato, obviamente requiere una evaluación posterior para localizar el defecto, ya que puede deberse a cualquier enzima del shunt de las pentosas, entre otras.

Método de tamizaje para deficiencia de G6PD con base en la fluorescencia del NADPH

Fundamento

Cuando la enzima G6PD se encuentra en el hemolizado, la glucosa-6-fosfato (G6P) es oxidada a

6-fosfogluconato (6-PGA) y el NADP es reducido a NADPH. Ya que la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6-PGD) está presente virtualmente en todos los hemolizados, ocurre una reducción adicional del NADP en la reacción catalizada por la G6PD. En hemolizados medianamente deficientes de G6PD, incubados en presencia de G6P y NADP, se forma una pequeña cantidad de NADPH. En presencia de glutatión oxidado (GSSG), que es parte de la mezcla reacción, el NADPH es reoxidado en la reacción catalizada por la glutatión reductasa. Por lo tanto, el método de tamizaje mide la diferencia entre aproximadamente dos veces la actividad de G6PD y la actividad de la glutatión reductasa.

Composición de 1 ml de mezcla de reacción

Reactivo	Volumen (ml)
G-6-F 10 mM	0,10
NADP 7.5 mM	0,10
Saponina 1%	0,20
Tampón Tris-HCl 750 mM, pH 7.8	0,30
GSSG 8 mM	0,10
Agua destilada	0,20

Esta mezcla se conserva bien por varios meses al guardarse a -70 °C.

Procedimiento (de acuerdo con Beutler y Mitchell)

Puede usarse sangre colectada en heparina, EDTA o solución ACD; o bien, en sangre colectada en papel filtro y secada. El ensayo se realiza adicionando 0,01 ml de sangre a 0,1 ml de mezcla de reacción e incubando a 37 °C durante 10 minutos; se toman alícuotas de

la mezcla de incubación a los 0 y 10 minutos y se colocan sobre papel filtro Whatman. Una vez secas las manchas, se examinan bajo luz ultravioleta de onda larga.

Se puede realizar también una dilución al 20% de la muestra (20 µl de eritrocitos empacados en 200 µl de salina) y tomar de esta los 0,01 ml y añadirlos a la mezcla de reacción. De esta manera, se puede observar la fluorescencia de la reacción.

Interpretación

En muestras normales la primera mancha puede fluorescer ligeramente, mientras que la mancha que corresponde a los 10 minutos de incubación fluorescerá de manera intensa. Las muestras deficientes mostrarán poca o ninguna fluorescencia en ambas manchas. Se recomienda examinar de forma simultánea una muestra de control normal junto con la muestra del paciente. Esta es una técnica diseñada para la detección de homocigotas y hemicigotas.

Cuantificación cinético-enzimática para la deficiencia de G6PD

Se trata de una reacción enzimática, rápida y simple para uso de rutina en la investigación confirmatoria de deficiencia de G6PD.

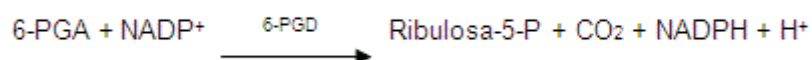
Principio

En la cuantificación cinético-enzimática, la actividad de la enzima se mide en dos pasos; en el primero se determina la conversión de NADP⁺ a NADPH en dos reacciones, una catalizada por la enzima G6PD y la otra por la enzima 6PGD. En el segundo paso, se mide la conversión de 6-fosfogluconato a ribulosa-5-fosfato y de NADP⁺ a NADPH, catalizada por 6PGD. Restando el segundo paso al primero, se obtiene la medida de la actividad de la G6PD.

La glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) cataliza la oxidación de la glucosa-6-fosfato (G6P):



La 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGD) cataliza la posterior oxidación del 6-PGA (6-fosfogluconato):



Para la determinación de la actividad de G6PD, se mide la velocidad de reducción del NADP⁺ a NADPH; sin embargo, la oxidación del 6-PGA también produce NADPH, por lo cual los resultados se elevan falsamente. Para corregir esta interferencia, se agrega un exceso de 6-PGA al tubo en el que se está determinando la enzima (tubo 1). A los resultados que se obtienen se les resta la actividad obtenida en un tubo que contiene todos los reactivos, excepto el G6P (tubo 2). La actividad de este segundo tubo corresponde al NADPH que se forma a partir del 6-PGA.

Reactivos

Agua destilada.
Buffer Tris-HCl 1 M pH 8.0, con EDTA 5 mM.

MgCl₂ 0,1 M.
NADP⁺ 2 mM (nicotinamida adenina dinucleótido difosfato).
6PGA 6 mM (ácido-6-fosfogluconico).
G6P 6 mM (glucosa-6-fosfato).

Procedimiento

Se utilizan muestras anticoaguladas con EDTA, de las cuales se separan los leucocitos y se hace un hemolizado (*ver procedimiento al final de este capítulo*) para realizar los siguientes pasos:

- 1- Mezclar los reactivos que se indican a continuación:

Reactivo	G6PD + 6-PGD	6PGD
	Tubo 1	Tubo 2
Agua destilada	480 µl	580 µl
Tris	100 µl	100 µl
MgCl ₂	100 µl	100 µl
NADP	100 µl	100 µl
Hemolizado	20 µl	20 µl

2- Incubar 10 minutos a 37 °C.

3- Agregar los siguientes reactivos:

Reactivo	G-6PD + 6-PGD	6-PGD
	Tubo 1	Tubo 2
G6P	100 µl	-----
6PGA	100 µl	100 µl

4- Leer la absorbancia a 340 nm a 37 °C.

Cálculo de actividad enzimática (AE)

$$AE = \sum \frac{Abs}{T} * \frac{1}{coef \text{ NADP}} * \frac{V \text{ final}}{V \text{ enz}} * \frac{Dilución}{gHb}$$

$$AE = \sum \frac{Abs}{t} * \frac{1}{6,22} * \frac{1}{0,02} * \frac{100}{gHb}$$

$$AE = 803,8 * \frac{Abs/t}{gHb}$$

- La ΔDO se mide a 340 nm a 37 °C. Se realizan seis lecturas de D.O. a intervalos de un minuto cada una. Se calcula la ΔDO/min para el tubo 1 y para el tubo 2 y al resultado del primero se le resta el resultado del segundo.
- Se hace una lectura de Hb al hemolizado.
- Con los resultados se realiza el siguiente cálculo:

$$AE = \frac{Abs/t}{gHb}$$

- Los resultados se expresan en UI/gHb.

Interpretación

Valores normales: 3,6-9,4 UI/gHb.

Valores menores a 3,6 sugieren la deficiencia de G6PD.

Comentarios

Es una prueba confirmatoria de deficiencia enzimática, para la cual se necesita un espectrofotómetro con rango ultravioleta para la lectura cinética y por tanto, de cubetas de cuarzo.

Se requiere de muestras de pacientes no transfundidos recientemente; de lo contrario, se debe solicitar una

nueva muestra alrededor de los tres meses posteriores a la transfusión, para confirmar el resultado.

Método electroforético para determinación de deficiencia de G6PD

El método electroforético brinda dos ventajas: la caracterización del genotipo con base en la movilidad de la(s) enzima(s) y la actividad en forma cualitativa de la o las fracciones. Sobre el medio de soporte (acetato de celulosa) se realiza una tinción que permite evaluar semicuantitativamente dicha actividad, la cual es producto de la reacción entre las fracciones electroforéticas no desnaturalizadas y una mezcla reactiva de MTT Tetrazolium.

Como se mencionó, esta electroforesis se efectúa en acetato de celulosa, en un sistema tampón y con revelado según la Organización Mundial de la Salud (OMS).

Otras metodologías para determinación de G6PD

Además de los métodos mencionados, existen otros como el de la reducción del 2,6 diclorofenolindofenol, los micrométodos basados en la reducción de la metahemoglobina, el método citoquímico que utiliza tetrazolium y los que usan juegos de reactivos de casas comerciales.

PIRUVATO QUINASA (PK)

La piruvato quinasa (PK) cataliza el paso final de la vía glicolítica, con la conversión de fosfoenolpiruvato a piruvato, y la conversión del difosfato de adenosina (ADP) a trifosfato de adenosina (ATP). Este es uno de los pasos relevantes en cuanto a producción de energía, debido a la generación del 50% del total del ATP en la vía de la glicólisis (Figura N° 1).

En los tejidos de los mamíferos se encuentran cuatro isoenzimas de PK:

- M1 en músculo esquelético.
- M2 en leucocitos, riñón, tejido adiposo y pulmón.
- L en hígado.
- R en glóbulos rojos.

Estas cuatro isoenzimas son producto únicamente de dos genes (PKLR y PKM). Las isoenzimas PKM1 y PKM2 son formadas por el gen PKM por *splicing* alternativo. Las isoenzimas PKL y PKR son producto del gen PKLR, transcritas por dos diferentes promotores específicos de tejido.

Aunque las anomalías en el gen PKLR pueden causar alteraciones tanto a nivel de eritrocitos como de hepatocitos, los síntomas clínicos son conferidos a los glóbulos rojos, ya que la deficiencia hepática puede ser compensada por la síntesis persistente de la enzima en el hepatocito.

La PK eritrocítica es una enzima alostérica, manifestando una cinética sigmoidea referente al fosfoenolpiruvato (PEP) en ausencia de fructosa difosfato. Cuando hay bajas concentraciones de PEP, la actividad de la enzima se incrementa de manera considerable por la fructosa difosfato. Esta enzima juega un papel crucial en el metabolismo eritrocitario a partir de su maduración, donde se vuelve absolutamente dependiente de la generación de ATP para mantener la integridad y funcionalidad de su membrana.

Deficiencia de piruvato quinasa

Esta deficiencia es de transmisión autosómica recesiva y tiene una distribución a nivel mundial, con una prevalencia estimada en 1:20.000 individuos dentro de la población caucásica. Al igual que la deficiencia de G6PD, generalmente es heterogénea, con mutaciones diferentes que causan cambios cinéticos y electroforéticos diferentes en la enzima que es formada. Estas anomalías incluyen alteración en la afinidad por el sustrato PEP y por el activador alostérico fructosa-1,6-difosfato.

La caracterización cinética y el análisis de los mutantes de PK es un proceso mucho más complejo que el involucrado en la deficiencia de G6PD.

Hasta la fecha, se han reportado más de 180 mutaciones en el gen PKLR; la mayoría de estas son de sentido equivocado (*missense*), afectando dominios importantes de la enzima relacionados con estructura y función.

La mutación 1529A es la más común en los Estados Unidos de América, así como en los países centrales y del norte de Europa. La mutación 1456T, por su parte, es prevalente en el sur de Europa, mientras que la mutación 1468T lo es en Asia.

La deficiencia de PK es la anomalía más frecuente de la vía glicolítica y es la causa más común de anemia hemolítica no esferocítica, junto con la reportada en la clase I de la deficiencia de G6PD, debida a hemólisis extravascular. La mayoría de los pacientes manifiestan únicamente los signos y síntomas usuales de una hemólisis crónica. La esplenectomía es efectiva en disminuir la hemólisis en la mayoría de los pacientes.

Lo anterior se explica porque la actividad deficiente de esta enzima lleva a la acumulación de sustratos como el 2,3 DPG, generando una baja afinidad de la hemoglobina por el oxígeno, lo cual termina en anemia.

La primera anemia hemolítica no esferocítica debida a deficiencia de PK fue descrita en 1961. Ya para 1983 se habían reportado más de 300 casos.

Método de escrutinio para la deficiencia de piruvato quinasa

Fundamento

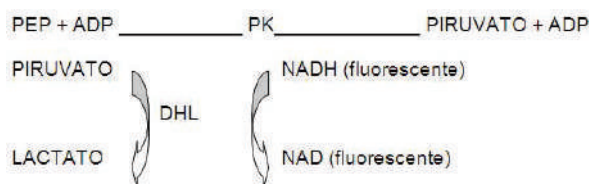
La piruvato quinasa (PK) cataliza la transferencia de un grupo fosfato del fosfoenolpiruvato y del ATP. La deshidrogenasa láctica (DHL) presente en el hemolizado, cataliza la reducción del piruvato a lactato y la concomitante oxidación del NADH (fluorescente) a NAD (no fluorescente). Si la actividad de PK está presente en la muestra de sangre, se formará piruvato, lo que puede ser visualizado por la oxidación del NADH o NAD con desaparición de la fluorescencia. Por el contrario, en ausencia de actividad de PK, no hay formación de piruvato, por lo que el NADH no se oxida y la fluorescencia persiste.

Debido a que los leucocitos de pacientes con deficiencia de PK tienen actividad normal de PK, es necesario remover las células blancas de la muestra

antes de realizar el tamizaje; esto se logra por tres medios: centrifugando la sangre y removiendo la capa leucocitaria ("Buffy coat"); empleando lisis hipotónica en lugar de un agente lítico como saponina; o utilizando resinas eliminadoras de leucocitos y plaquetas. Estas

resinas se preparan a partir de celulosa microcristalina (CE) y Sigma cell (en volúmenes iguales).

Reacciones enzimáticas involucradas en el método de tamizaje para la deficiencia de PK



Composición de 1 ml de mezcla de reacción

Reactivos	Volumen
Fosfoenolpiruvato 0.15 M (neutralizado)	0,03 ml
ADP 30 mM (neutralizado)	0,10 ml
NADH 15 mM (neutralizado)	0,10 ml
MgCl ₂ 80 mM	0,10 ml
Tampón K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ 0.25 M, pH 7.4	0,05 ml
Agua	0,62 ml
Neutralizar con NaOH 0.2 M, entre pH 7-8, medido con papel pH.	

** La mezcla es inestable (una semana a -70 °C).

Procedimiento (de acuerdo con Beutler)

Se usa sangre colectada en heparina, EDTA o solución de ACD. Se centrifuga la sangre, se remueve el plasma y la capa intermedia de leucocitos y plaquetas por aspiración o utilizando las resinas separadoras de leucocitos (*ver procedimiento*). Se prepara una suspensión de eritrocitos al 20% en salina 0,85%; de esta se toman 0,01 ml y se adicionan a 0,10 ml de mezcla de reacción, incubando a 37 °C durante 30 minutos. Se toman alícuotas de la mezcla de incubación a los 0 y 30 minutos, las cuales se colocan en papel filtro Whatman. Una vez secas las manchas, se examinan bajo luz ultravioleta de onda larga.

Interpretación

Todas las manchas de 0 minutos fluorescerán intensamente. En muestras de sujetos normales la fluorescencia desaparece en la mancha de 30 minutos. En muestras de sujetos deficientes de PK la fluorescencia persistirá en ambas manchas. Es recomendable examinar de manera simultánea una muestra de control normal en unión de la muestra del paciente.

Comentarios

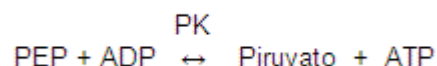
Ciertos reactivos utilizados, sobre todo el NADH, son muy inestables, por lo que es necesario prepararlos diariamente. Por esta razón, se recomienda tener lista la mezcla de reactivos sin el NADH, ya que este se agrega al momento de montar la prueba.

Cuantificación cinético-enzimática para la deficiencia de PK

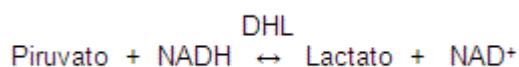
Se trata de una reacción enzimática, rápida y simple para uso de rutina en la investigación confirmatoria de deficiencia de PK.

Principio

El principio de la prueba es el siguiente:



El piruvato formado es reducido a lactato en una reacción catalizada por la lactato deshidrogenasa, con la conversión de NADH a NAD⁺:



Esta reacción es asegurada por la adición de deshidrogenasa láctica (DHL) a la mezcla de reacción. De tal forma, la actividad piruvato quinasa es medida por la densidad óptica a 340 nm.

Reactivos

Agua destilada.
Buffer Tris-HCl 1M pH 8.0, con EDTA 5 mM.
MgCl₂ 0.1M.
KCl 1M.
PEP 50 mM (fosfoenolpiruvato).
ADP 30 mM (adenosina 5-difosfato).

NaHCO₃ al 1%.

NADH 2 mM (nicotinamida adenina dinucleótido reducido).

DHL 60 U/L (deshidrogenasa láctica o lactato deshidrogenasa).

Solución estabilizante.

β-Mercaptoetanol.

Procedimiento

Se utilizan muestras anticoaguladas con EDTA, de las cuales se separan los leucocitos y se realiza un hemolizado (*ver procedimiento más adelante*) para efectuar los siguientes pasos.

1. Mezclar los reactivos que se indican a continuación:

Reactivo	Tubo estándar (E)	Tubo blanco (B)
Agua destilada	330 µl	380 µl
Tris	100 µl	100 µl
KCl	100 µl	100 µl
MgCl ₂	100 µl	100 µl
NADH *	100 µl	100 µl
ADP	50 µl	-----
DHL *	100 µl	100 µl
Hemolizado	20 µl	20 µl

* Reconstituir de la siguiente forma, al momento de utilizar:

- NADH: reconstituir en solución estabilizante.
- DHL 60 U/ml: realizar el cálculo y disolver en mezcla recién preparada de 5 ml solución estabilizante y 5 µl mercaptoetanol.

Ejemplo:

Si se cuenta con DHL 1.000 unidades y se quieren preparar 500 µl, entonces:

$$500 \mu\text{l} * 60 \text{ U/ml} = X * 1.000 \text{ U/ml.}$$

$$X = 30 \mu\text{l.}$$

Entonces, se disuelven 30 µl de DHL 1.000 unidades en 470 µl de la mezcla preparada de solución estabilizante con mercaptoetanol.

El resto de reactivos se resuspenden en agua destilada, excepto el ADP que se reconstituye en NaHCO₃ al 1%.

2. Incubar 10 minutos a 37 °C.
3. Agregar 100 µl de PEP 50 mM a ambos tubos.
4. Leer la absorbancia a 340 nm a 37 °C.

Cálculo de actividad enzimática (AE)

$$AE = \sum \frac{\text{Abs}}{T} * \frac{1}{\text{coef NADP}} * \frac{V \text{ final}}{V \text{ enz}} * \frac{\text{Dilución}}{\text{gHb}}$$

$$AE = \sum \frac{\text{Abs}}{t} * \frac{1}{6,22} * \frac{1}{0,02} * \frac{100}{\text{gHb}}$$

$$AE = 803,8 * \frac{\text{Abs}/t}{\text{gHb}}$$

- La ΔDO se mide a 340 nm a 37 °C. Se realizan seis lecturas de DO a intervalos de un minuto cada una. Se calcula la ΔDO/min para el tubo E y el tubo

B y al resultado del primero se le resta el resultado del segundo.

- Se hace una lectura de Hb al hemolizado.
- Con los resultados se realiza el siguiente cálculo:

$$AE = \frac{\text{Abs}/t}{\text{gHb}}$$

- Los resultados se expresan en UI/gHb.

Interpretación

Valores normales: 2,0 – 6,4 UI/gHb.

Valores menores a 2,0 UI/gHb sugieren la deficiencia de G6PD.

Comentarios

Es una prueba para la cual se necesita un espectrofotómetro con rango ultravioleta para la lectura de la actividad enzimática, por lo que se utilizan cubetas de cuarzo.

Se requieren muestras de pacientes no transfundidos recientemente, de lo contrario, se debe solicitar una nueva muestra alrededor de tres meses después de la transfusión, para confirmar el resultado.

PIRIMIDINA 5' NUCLEOTIDASA

La maduración del eritrocito se acompaña por la degradación de ARN y la liberación de mononucleótidos. Las pirimidinas 5' nucleotidasas (P5'N), conocidas también como uridinas 5 monofosfato hidrolasas, son enzimas involucradas en la desfosforilación de nucleótidos de pirimidinas.

Se han aislado dos formas citoplasmáticas de la enzima en eritrocitos humanos: P5N1 y P5N2. Estas tienen propiedades moleculares distintas, sustratos específicos y bases genéticas diferentes en cuanto a enfermedades asociadas. La deficiencia de P5N1 es la que lleva a anemia hemolítica. El gen que codifica para la isoforma P5N1 se localiza en el brazo pequeño del cromosoma 7 (7p14.3).

Deficiencia de pirimidina 5' nucleotidasa

La deficiencia de P5'N es probablemente la tercera eritroenzimopatía hereditaria más frecuente, luego de las deficiencias de las enzimas G6PD y PK. Es un desorden autosómico recesivo, que cursa con anemia moderada, reticulocitosis, hiperbilirrubinemia y esplenomegalia.

El frotis sanguíneo es muy sugestivo, debido a la presencia de un prominente punteado basófilo, atribuido a la inhibición de ribonucleoproteínas como consecuencia del bloqueo en la hidrólisis de nucleótidos de pirimidina, por el déficit enzimático.

La hemólisis suele ser de media a moderada, aunque se han reportado ciertos casos de hemólisis severa.

Esta deficiencia es poco común, aunque tiene una amplia distribución geográfica y ha sido descrita en muchas partes del mundo. Desde su primera descripción (1974) hasta la fecha, se han reportado poco más de 60 casos como deficientes de P5'N en todo el mundo; se presume que un gran número no han sido detectados.

Método de escrutinio para pirimidina 5' nucleotidasa (Beutler)

Principio

Los nucleótidos de los eritrocitos están conformados en su mayor parte por derivados púricos (principalmente adenina). Normalmente, el contenido de nucleótidos de pirimidina (citidina y uridina) es muy bajo. Las soluciones acidificadas de nucleótidos de citidina tienen un pico máximo de absorción a 280 nm, mientras que los nucleótidos de adenina, guanina y uridina lo tienen a 260 nm.

Al determinar la razón de absorción 260 nm/280 nm se puede detectar el relativo incremento en los nucleótidos de citidina. La razón de las absorciones disminuye al acumularse los nucleótidos de citidina. En la deficiencia de pirimidina 5' nucleotidasa (P5'N) se produce una acumulación de nucleótidos de pirimidina por una hidrólisis deficiente de estos.

Reactivos

Solución de NaCl 0,9% (pH 7.4).

Solución de ácido perclórico (PCA) al 4%.

Tampón de glicina 1 M, pH 3.0.

Procedimiento (según Beutler)

- a) Se centrifuga sangre fresca tomada con EDTA, se elimina el plasma y se lavan los eritrocitos tres veces con la solución salina. Se prepara una suspensión de eritrocitos en salina al 50%.
- b) De la suspensión se toman 3 ml y se agregan 12 ml de PCA al 4%; se mezcla y se centrifuga para obtener el sobrenadante, el cual se transfiere a otro tubo.

- c) A la vez, se prepara un extracto blanco, añadiendo 3 ml de NaCl 0,9% a 12 ml de PCA.
- d) Se realiza una mezcla por duplicado con 500 µl de H₂O destilada y 300 µl del tampón de glicina. La mezcla se puede hacer en tubos pequeños limpios o directamente en dos cubetas de cuarzo.
- e) A uno de los tubos (cubetas) se agrega 200 µl del extracto blanco (punto c) y al otro 200 µl del sobrenadante (b) que corresponde a la muestra. Se mezcla cada tubo y se lee la densidad óptica a 260 nm y 280 nm, en cubetas de cuarzo.

La lectura de la muestra se realiza contra el extracto blanco y se ajusta con este a 260 nm; luego de leer la muestra, se repite el procedimiento a 280 nm.

Interpretación

La razón de las absorbancias 260 nm/280 nm se calcula restando de la lectura de muestra la lectura del blanco (positivo o negativo), a cada una de las longitudes de onda.

$$R = \frac{\text{Muestra (260)} - \text{blanco (260)}}{\text{Muestra (280)} - \text{blanco (280)}}$$

Valores reportados

Normales: 3,11 ± 0,41 (Beutler)
3,13 ± 0,27 (CIHATA)

Deficientes: valores menores a 2,29 sugieren la deficiencia de P5'N.

En el único caso de deficiencia P5'N hallado en Costa Rica, el valor de R fue de 1,25.

TAMPONES FISIOLÓGICOS PARA PREPARAR SUSPENSIONES DE ERITROCITOS

Tampón fosfato: pH = 7.4 (PBS)

NaCl 1 M	148 ml
KCl 1 M	5 ml
Na ₂ HPO ₄ 1 M	8,4 ml
Llevar pH a 7,4 con NaOH 0,1 M	
Agua c.s.p.	1.000 ml

Tampón tris: pH 7.7

NaCl 1M	140 ml
KCl 1M	5 ml
MgCl ₂ 0,5 M	2 ml

Na ₂ HPO ₄ 1 M	1 ml
Tris-HC. 1 M, pH	20 ml
H ₂ O c.s.p.	1.000 ml

SEPARACIÓN DE LEUCOCITOS Y PREPARACIÓN DE HEMOLIZADO PARA DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE G-6PD y PK

Reactivos

Resina

- Tomar pesos iguales (2 g) de α- celulosa y Sigma cell tipo 50.
- Mezclar con 500 ml de NaCl 0,15M.

Solución estabilizante

- Medir 10 ml de EDTA sal disódica 10% [0,27 M] y neutralizarlo a pH 7.0
- Llevar a 1 L con agua desionizada.

Solución estabilizante + 2-β-mercaptoetanol

- Se mezcla: 5 µl de 2-β-mercaptoetanol con 5 ml de solución estabilizante.
- Preparar al momento de usar.

Muestra

Sangre total con EDTA o heparina, mantenida en refrigeración, sin mucho tiempo de tomada.

Separación de leucocitos

Este procedimiento se realiza porque los leucocitos también tienen actividad de G6PD y PK; al separarlos se asegura el no reportar un valor mayor al real para la deficiencia de G6PD o de PK eritrocítica.

Procedimiento

- En el fondo de una jeringa plástica (5 ml) acondicionar una pieza de papel filtro Whatman Nº 1. Colocar la jeringa sobre un tubo cónico.
- Añadir 2 ml de resina y lavar con 5 ml de NaCl 0,15 M. Descartar lo recuperado en el tubo cónico. La resina se compone de Sigma cell y alfa celulosa.
- Pasar por la resina 1 ml de la muestra.
- Eluir con 4 ml de NaCl 0,15 M.
- Recoger los glóbulos rojos en solución salina, en un tubo cónico.
- Centrifugar a 3000 rpm durante cinco minutos y lavar con NaCl 0,15 M.

- Repetir centrifugación dos o tres veces hasta que el sobrenadante se observe claro.
- Suspender los glóbulos rojos en un volumen de NaCl 0,15 M.

Preparación del hemolizado

- Realizar una dilución 1/20: 200 µl de la suspensión de glóbulos rojos en 1,8 ml de la solución estabilizante + 2-β-mercaptoetanol.
- Congelar y descongelar para mantener el hemolizado.

Nota: la determinación enzimática puede efectuarse luego de dos horas de preparado el hemolizado si se congela a -70 °C y se descongela.

Lectura del hemolizado

- Mezclar 200 µl del hemolizado con 5 ml de reactivo de Drabkin.
- Incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
- Leer la absorbancia a 540 nm contra blanco de reactivo (reactivo de Drabkin).
- Calcular gramos de Hb: $gHb = Abs \times 3,67$.

Valor de referencia del hemolizado: 0,8 - 1,0 gHb.

BIBLIOGRAFÍA

Balta G, Gumruk F, Akarsu N, Gurgey A, Altay C. Molecular characterization of Turkish patients with pyrimidine 5' nucleotidase-I deficiency. *Blood* 2003; 102(5): 1900-1903.

Beutler E. A series of new screening procedures for pyruvate kinase deficiency, glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, and glutathione reductase deficiency. *Blood* 1996; 28(4): 553-562.

Beutler E. Red cell metabolism: a manual of biochemical methods. 3 ed. New York: Grune-Stroton; 1984.

Beutler E, West C, Blume KG. The removal of leukocytes and platelets from whole blood. *J Lab Clin Med* 1976; 88(2): 328-333.

Brewer GJ, Tarlov AR, Alving AS. The metehemoglobin reduction test for primaquine-type sensitivity of erythrocytes. A simplified procedure for detecting a specific hypersusceptibility to drug hemolysis. *JAMA* 1962; 180: 386-388.

Capellini MD, Fiorelli G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Lancet* 2008; 371(9606): 64-74.

Guindo A, Fairhurst RM, Doumbo OK, Wellems TE, Diallo DA. X-Linked G6PD deficiency protects hemizygous males but not heterozygous females against severe malaria. *PLoS Med* 2007; 4(3): 516-522.

Lyon MF. Gene action in the X-chromosome of the Mouse (*mus musculus* 1). *Nature* 1961; 190: 372-373.

Manganelli G, Masullo U, Passarelli S, Filosa S. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: Disadvantages and posible benefits. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* 2013; 13(1): 73-82.

Mason PJ, Bautista JM, Gilsanz F. G6PD deficiency: the genotype-phenotype association. *Blood Rev* 2007; 21(5): 267-283.

Salvador A, Savageau MA. Quantitative evolutionary design of glucose 6-phosphate dehydrogenase expression in human erythrocytes. *PNAS* 2003; 100(24): 14463-14468.

Van Wijk R, van Solinge WW, Nerlov C, Beutler E, Gelbart T, Rijkssen G, *et al.* Disruption of a novel regulatory element in the erythroid-specific promoter of the human PKLR gene causes severe pyruvate kinase deficiency. *Blood* 2003; 101(4): 1596-1602.

Zanella A, Fermo E, Bianchi P, Chiarelli LR, Valentini G. Pyruvate kinase deficiency: the genotype-phenotype association. *Blood Rev* 2007; 21(4): 217-231.

Zanella A, Gordon-Smith EC. Disorders of red cell metabolism. En: Hoffbrand AV, Catovsky D, Tuddenham E, Green AR. *Postgraduate haematology*. 6 ed. Wiley- Blackwell; 2011. p. 140-157.

DETERMINACIÓN DE HAPTOGLOBINAS, HEMOGLOBINA PLASMÁTICA, METAHEMOGLOBINA Y OTRAS PRUEBAS DE PERFIL HEMOLÍTICO

Dr. Walter E. Rodríguez Romero
Dr. German F. Sáenz Renauld

HAPTOGLOBINAS SÉRICAS

Las haptoglobinas (Hp) son glicoproteínas polimórficas, genéticamente determinadas y constituyentes del plasma normal, que reaccionan estequiométricamente con la hemoglobina (Hb). Su función primaria consiste en unirse de forma irreversible con la Hb libre, tanto *in vitro* como *in vivo*, formando un complejo soluble y estable (Hb-Hp), que es catabolizado de manera rápida por el hígado. A pesar de su marcada estabilidad, este complejo, cuyo promedio de vida es de alrededor de 60-90 minutos, no comprende uniones covalentes y presenta una intensa actividad peroxidásica.

Por electroforesis en gel de almidón se pueden distinguir al menos tres tipos hereditarios distintos de Hp. El patrón de herencia sugiere un sistema de dos alelos con dos formas homocigóticas (Hp 1-1, Hp 2-2) y una forma heterocigota (Hp 2-1). Todos esos tipos de Hp contienen dos clases de cadenas polipeptídicas (Hp-alfa y Hp-beta), las cuales se encuentran bajo un control genético separado. Al igual que sucede con la molécula de Hb, se han descrito variantes de cadenas alfa y beta y de un genotipo Hp- (ahaptoglobinemia).

Las haptoglobinas poseen una elevada afinidad para la α globina, sea libre o combinada con radicales heme. No se unen a compuestos aferro- o ferrihemes ni a la mioglobina. La afinidad de las haptoglobinas por la oxihemoglobina, la metahemoglobina, la cianometahemoglobina y la carboxihemoglobina es igual.

Las hemoglobinas humanas A_0 , A_2 , F, Lepore, C, I y S se unen de forma semejante con la haptoglobina sérica humana; sin embargo, las hemoglobinas H y Bart no lo hacen, porque estas dos variantes no poseen las cadenas globínicas de tipo alfa necesarias para dicha unión.

Debido a que las haptoglobinas proveen un método satisfactorio para seguir el estado de actividad de ciertas enfermedades, en algunos hospitales estas son utilizadas como "reactantes de fase aguda", al igual que se utiliza el valor de la eritrosedimentación.

Considerando la combinación estequiométrica entre la Hp y la Hb, la mayoría de los métodos que se han propuesto para la cuantificación de esa proteína se basan en la capacidad de combinación de la Hb. En muchos de estos métodos se añade un exceso de Hb al suero, para saturar la Hp; la cantidad formada del complejo Hb-Hp se estima por su actividad peroxidásica. Este complejo también puede ser separado de la Hb libre por electroforesis, en vista de su mayor movilidad, migrando entre las α_2 y las beta globulinas, o por filtración en geles, por su mayor tamaño molecular. Además, se pueden utilizar técnicas de electroinmunoensayo y de radioinmunoensayo.

MÉTODO DE PEROXIDACIÓN

Principio

La Hp del suero se combina con metaHb (en la modificación del CIHATA con CNmet Hb) para formar el complejo Hp-Hb, que se mide a través de su efecto catalizador (de tipo peroxidásico) sobre la oxidación del guayacol por el H_2O_2 , para dar tetraguayacol; la cantidad de Hp se expresa en términos de Hb combinada en mg/dl. Las condiciones de la prueba son tales que la actividad peroxidásica de la Hb libre es esencialmente nula, ya que el guayacol como sustrato reductor a concentraciones mayores a 2,5 mM, actúa como un poderoso inhibidor de la Hb libre. Por otra parte, su pH de 4.0 permite evidenciar la máxima actividad peroxidásica del complejo Hp-Hb, al ser nula la de la Hb libre. La concentración de H_2O_2 al 0,05 M se escogió por ser la que da mejores grados de reacción.

Reactivos

Muestra

Se puede utilizar suero o plasma con EDTA o citrato de sodio.

Guayacol 0,030 M

Se disuelven 3,72 g de guayacol G.A. (o 3,33 ml si es líquido -sigma G5502, BDH o Merck 4212-) en 700 ml

de agua desionizada; luego se adicionan 100 ml de ácido acético 1 M. El pH de la solución se ajusta a 4.0 con NaOH 1 M. Se afora con H₂O desionizada a un litro. Se guarda la solución en un recipiente ámbar en refrigeración. En estas condiciones el reactivo es estable por unas 2-3 semanas.

De acuerdo con el volumen de trabajo del laboratorio, el reactivo se puede dispensar en viales de 100 ml, los cuales se congelan a -20 °C. Al momento de su uso, el contenido de cada vial se deja descongelar a temperatura ambiente. La estabilidad del reactivo congelado es de varios meses.

Peróxido de hidrógeno 0,05 M

Este reactivo se prepara 30 minutos antes de ser utilizado, a partir de una solución de H₂O₂ al 30%, y se diluye en balón aforado a 100 ml con H₂O desionizada.

Solución Salina 0,15 M

Se pesan 8,7 g de NaCl y se diluyen con H₂O desionizada a un litro.

Solución de cianometahemoglobina (HiCN) (50 mg/dl)

Una manera práctica de obtener el estándar de HiCN de 50 mg/dl, es diluyendo adecuadamente una solución de cianometahemoglobina que posea concentraciones de 60-80 mg/dl. Por ejemplo, a partir del CIANO-UCR ($\pm$ 80 mg/dl), se puede alcanzar de forma rápida la concentración de 50 mg/dl, con el uso del coeficiente de extinción milimolar de 11,0 a 540 mm, para un peso molecular de 16.700 (g/dl de HiCN), el cual se describe a continuación:

$$\text{HiCN} = \frac{\text{DO}^{540} \times 16144,5 \times F}{11,0 \times 1 \times 10}$$

Donde

DO⁵⁴⁰= absorbancia de la solución de HiCN.

16.144,5= masa molecular relativa de la Hb (derivada de 64458).

F= factor de dilución (1:251).

11,0= coeficiente de absorción milimolar de la HiCN a 540 mm.

1= paso de la luz en centímetros (cubeta cuadrada 1 X 1 cm).

Si el estándar está correctamente preparado (50 mg/dl), su densidad óptica (DO) X 36,8 deberá dar un valor de 12,5 g/dl.

La ventaja de usar este reactivo de HiCN, en vez del de metaHb, estriba en su gran estabilidad a 4 °C y su fácil preparación.

Solución de metahemoglobina (MetHb) (50 mg/dl)

Como reactivo alternativo se puede preparar MetHb, en vez de HiCN. A ocho volúmenes de eritrocitos humanos lavados tres veces con solución salina, se le adicionan tres volúmenes de H₂O desionizada y un volumen de tetracloruro de carbono. Se mezcla por agitación y luego se centrifuga. El hemolizado lípido se obtiene con pipeta.

Posteriormente, se determina la concentración de Hb y se diluye el hemolizado a una concentración de 1 g/dl. A 25 ml de este se le añaden 10 ml de ferricianuro de potasio (100 mg/dl), a fin de convertir la Hb en metaHb. Se deja 10 minutos en reposo y se afora a 500 ml con H₂O desionizada (manteniendo las proporciones se pueden preparar volúmenes menores). En viales se dispensan volúmenes de 10-20 ml y se guardan a 0 °C. La solución de metaHb es estable por varias semanas. A -20 °C la conservación es aún mayor.

Mezcla de bancos de sueros

Se prepara un banco a partir de sueros o plasmas de sujetos normales y se almacena en viales de 5 ml bajo congelación a -20 °C. Se ha comprobado la estabilidad de estos bancos de suero al menos por seis meses.

Curva de calibración

- Se preparan tubos de ensayo 12 X 75 mm, numerados de 1 a 10, a los cuales se les adiciona cantidades crecientes de suero (0,0 a 0,9 ml); luego se ajustan con solución salina a un volumen final de 1 ml. Finalmente, se adiciona 1 ml de la solución de HiCN o metHb.

Se mezcla y se incuba 15 minutos en un baño con tapa a 25 °C (Cuadro N° 1).

Cuadro N° 1. Marcha analítica para la realización de la curva de calibración de Hp										
	Número del tubo									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Solución salina	1,0	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1
Banco de sueros	-	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
Solución HiCN o MetHb	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

- b. En 11 tubos numerados de 0 a 10 se pipetea 2,5 ml de la solución de guayacol y luego se colocan en el baño a 25 °C. El tubo 0 corresponde al blanco de reactivos.
- c. A los 15 minutos se toma una alícuota de 50 µl de solución salina. A intervalos de 30 segundos, se le adicionan a los tubos de reacción 500 µl de la solución de trabajo de H₂O₂. Se mezclan bien por inversión y se dejan en reposo por ocho minutos en el baño a 25 °C.

Al cumplir los ocho minutos de reacción para todas las mezclas reactivas, se sacan los tubos con el mismo intervalo de 30 segundos, para la lectura de la DO; el espectrofotómetro debe estar previamente calibrado a cero DO con el blanco de reactivos y a 470 nm.

La lectura de las soluciones de cada dilución reactante no debe pasar los cuatro minutos; de otra suerte, se obtendrá una disminución de la DO al perder color la reacción. Asimismo, los tubos no deben exponerse a la luz intensa antes de que se hagan las lecturas, pues el producto coloreado es inestable.

- d. Haciendo uso de papel milimétrico, se deben graficar de la siguiente forma los valores obtenidos: en el eje de las ordenadas colocar las DO y en las abscisas los volúmenes de suero. Se obtendrá una curva semejante a la que se muestra en la Figura N° 1.

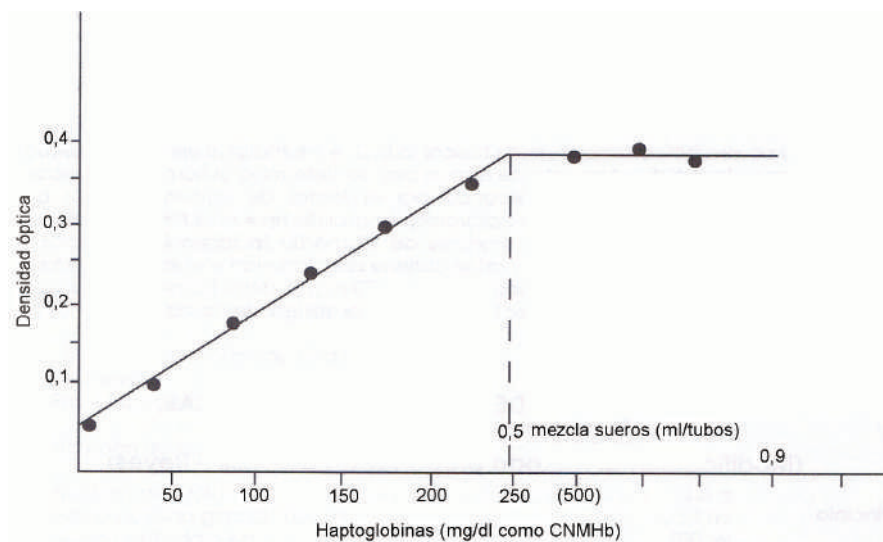


Figura N° 1. Curva de calibración de Hp (peroxidación).

La curva que se traza es la de mejor ajuste, ya sea visual o matemáticamente (esta última con el uso de la ecuación de una línea recta, $y=mx+b$),

utilizando los seis primeros puntos, antes de que la curva se aplane. A este nivel se observa cómo al trazarla los puntos muestran un aumento lineal

y luego un punto de inflexión brusco, el cual corresponde al volumen de suero mezclado no diluido, que basta para fijar toda la cianometahemoglobina (CNMHB) adicionada (50 mg/dl). La abscisa correspondiente a este punto de inflexión representa el nivel sérico de haptoglobinas (50 mg/dl), expresado como CNMHB fijada. Como los sueros problema son diluidos 1:5, el valor extrapolado es de 250 mg/dl. En las abscisas entre el origen y el punto correspondiente a 250 mg/dl, se marcan intervalos de 25 mg/dl. Posteriormente, se deben comparar las lecturas problema con la proporción lineal de la curva de calibración (FC), dividiendo 250 mg/dl entre el número total de cuadros que se hallan desde el punto cero hasta el punto de inflexión.

Procedimiento (micrométodo)

- Se hace una dilución 1:5 del suero problema con solución salina (100 μ l + 400 μ l solución salina). Se alistan dos tubos de 12 x 75 mm, rotulados como P1 (paciente) y B1 (blanco); en el primero se pipetea 100 μ l de la solución HiCN y en el segundo 100 μ l de agua desionizada. Ambos se incuban por 15 minutos a 25 °C. Luego, se colocan dos tubos de 16 x 100 mm, marcados como P y B. En ambos se pipetea 2,5 ml de solución de guayacol y se dejan en reposo por 10 minutos. También se coloca en baño un tubo con la solución de H₂O₂, para que se equilibren las temperaturas.
- Al cumplirse los 15 minutos de incubación, al tubo P (que contiene guayacol) se le añaden 50 μ l de la solución de H₂O₂ que está en el baño; se mezcla por inversión tres veces y se pone en el reloj (en caso de tener varias muestras, se agrega el peróxido a intervalos de 30 segundos, teniendo presente que se sacarán del baño en ese mismo intervalo). Se coloca la tapa del baño y se incuba por ocho minutos. Durante el período de incubación se establece el cero del espectrofotómetro con agua destilada a 470 nm (con un instrumento de tipo filtro, que puede ser azul).
- Tras los ocho minutos de incubación, se lee la DO de los tubos P y B. Para los cálculos, se resta la DO del blanco a la del problema y el resultado se lleva a la curva de calibración, para buscar la DO e interpolar el eje de las abscisas. Se obtiene el valor directamente de esta, o bien, se determina el número de cuadros para el suero problema, multiplicando por el factor de calibración (FC) (mg/dl de Hp = FC x N° de cuadros). El método no es sensible para valores menores a 10 mg/dl. En tales circunstancias, se recomienda usar el suero sin diluir y así se obtiene directamente el valor. Por otro lado, si el valor inicial de una incógnita sobrepasa los 250 mg/dl, debe hacerse una dilución conveniente que permita una lectura dentro del rango de la calibración (0-250 mg/dl).

CUANTIFICACIÓN DE HP POR ELECTROFORESIS

Principio

La concentración de haptoglobinas en el suero se mide indirectamente al acondicionarse una cantidad conocida de hemoglobina (400 mg/dl), la cual es mayor que la capacidad de unión de la haptoglobina. La mezcla se incuba y la fracción de hemoglobina libre se separa por electroforesis de la hemoglobina ligada. Los porcentajes de las fracciones se calculan por densitometría, que determina la concentración de haptoglobinas. Para efectos prácticos, una rápida visualización de las fracciones electroforéticas obtenidas, permite discriminar valores altos y bajos de haptoglobinas séricas.

Reactivos

- Solución de hemoglobina de 400 mg/dl (puede usarse una solución de HiCN).
- Controles.
- Suero normal.
- Suero de cordón umbilical (no contiene haptoglobinas).
- Tampón de fosfatos 0,05 M pH 6.4.

Solución A:

KH ₂ PO ₄	1,713 g
Agua destilada c.s.p.	500 ml

Solución B:

KH ₂ PO ₄	3,363 g
Agua destilada c.s.p.	500 ml

- Solución de trabajo 0,05 M pH 6.4

Solución A:	73,2 ml
Solución B:	26,8 ml

- Solución ácido acético 5%

Ácido acético glacial A.R.A.	50 ml
Agua destilada c.s.p.	1.000 ml

- Cintas o placas de acetato de celulosa

- Solución alcohólica de o-dianisina

O-dianisina	0,143 g
Etanol al 95% c.s.p.	100 ml

- Tampón de acetato 1,5 M pH 4.7

Acetato de sodio	1,6 g
Ácido acético glacial 1000 ml	0,53 ml
Agua destilada c.s.p.	500 ml
Ajustar el pH final 4.6-4.7, con ácido acético glacial	

- Peróxido de hidrógeno al 3%

- Solución de trabajo de o-dianisina

Solución alcohólica de o-dianisina	40 ml
Tampón de acetato pH 4.6-4.7	10 ml
Peróxido de Hidrógeno 3%	10 ml
Preparar esta solución inmediatamente antes de su uso	

- Solución bencidina 0,2%

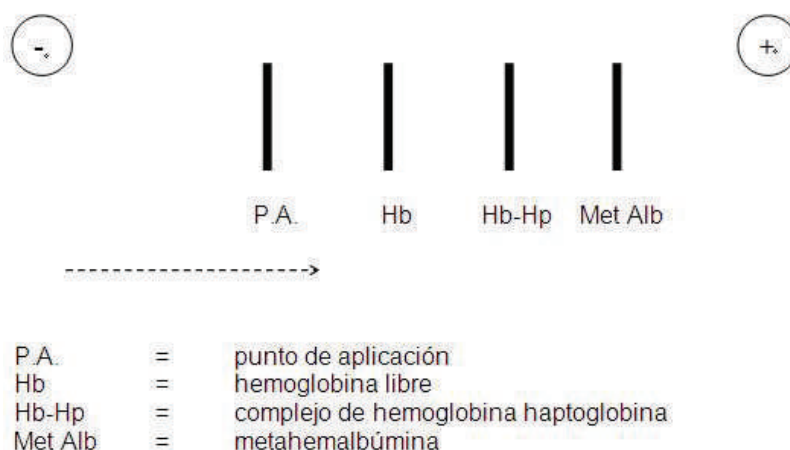
Bencidina	0,2 g
Ácido acético glacial	90 ml
Agua destilada c.s.p.	100 ml

- Solución de trabajo bencidina

Bencidina 0,2%	10 ml
Peróxido de hidrógeno 30%	2 gotas

Método

- En un tubo de ensayo se colocan 0,5 ml de la solución de Hb de 400 mg/dl y 0,5 ml de suero por analizar. Se incuba a 37 °C durante 30 minutos.
- Se colocan las cintas o placas de acetato de celulosa en la solución de trabajo durante 30 minutos. Se retira el exceso de tampón entre dos hojas de papel de filtro.
- Se pone la solución de trabajo en la cámara (cubas) y las cintas en los soportes de la cámara de electroforesis. Se hace contacto entre las cintas y el tampón de la cámara con esponjas especiales.
- Con un aplicador, se pone la solución suero-hemoglobina en las cintas.
- La corrida es realizada durante 30 minutos con una diferencia potencial de 200 voltios.
- Después de la corrida, se desconecta la cámara, se retiran las cintas y se sumergen en ácido acético al 5% durante 10 minutos. El exceso de ácido se remueve tocando los bordes del depósito.
- Las cintas se colocan en la solución de trabajo de o-dianisina, o bien, de bencidina, durante cinco minutos. No se deben agitar las cintas cuando se encuentren en esta solución.
- Se lavan las cintas con agua destilada (tres veces).
- Se observan las cintas y se interpretan los resultados. El orden de la migración del polo negativo (punto de aplicación) al polo positivo es la siguiente:



- La densitometría se hace para cuantificar la haptoglobina, usando un filtro de 420 nm.

Cálculo

Concentración Hp (mg/dl) = porcentaje complejo Hb-Hp x 4.

Valores normales: 100 ± 25 g/dl.

DETERMINACIÓN DE LA HAPTOGLOBINA PLASMÁTICA POR GEL-FILTRACIÓN (Lionett et al, con ligeras modificaciones)

Principio

El método de gel filtración se basa en la propiedad que tienen las resinas tipo Sephadex de separar las proteínas con diferente peso molecular. Esta resina consiste en un polímero de carbohidratos muy hidratados, cuyas partículas pueden prepararse de distintos tamaños. Las columnas confeccionadas con ella pueden separar proteínas de diferentes tamaños, porque estas difieren en su capacidad de penetrar los poros de la resina.

Las moléculas de proteínas con menor tamaño, que pueden penetrar los poros de forma más eficaz, fluyen con lentitud a través de la columna; las más grandes migran más rápido, ya que no pueden penetrar dichos poros. De esta manera, se van separando las diversas proteínas al fluir a través de la columna y pueden ser recogidas en fracciones perfectamente puras.

La hemoglobina tiene un peso molecular de 64.000 g/mol, mientras que el del complejo Hb-Hp es de aproximadamente 300.000 g/mol. Esta diferencia en el tamaño de las moléculas permite que se puedan separar de manera perfecta en la columna de Sephadex G- 100 (BIORAD o similar).

Reactivos

- Sacarosa.
- Hemolizado de 10 g/dl (puede utilizarse el hemolizado HEMO-UCR de concentración conocida).

Preparación del hemolizado

Se toman 5 ml de sangre total y se lavan los glóbulos tres veces con solución salina. Después, se hemolizan

añadiendo 1,5 volúmenes de agua desionizada por cada volumen de glóbulos y agitando. En ese momento, se agrega un volumen de CCl_4 y se agita vigorosamente. Se centrifuga la solución a 3.000 r.p.m. durante 10 minutos. En la capa superior se obtiene un hemolizado claro con una concentración aproximada a 10 g/dl. Este sobrenadante se separa con una pipeta Pasteur y se guarda en congelación.

Solución salina al 0,9%

NaCl (A.C.)	9,0 g
Agua destilada c.s.p.	1.000 ml

La resina se prepara hinchando 20 g de Sephadex G-100 en un litro de solución salina, durante 20 horas. En una columna de 2,8 cm de diámetro por 60 cm de alto se coloca lana de vidrio en el tapón inferior y se le añade resina hasta una altura de 52 cm. Después se coloca en el orificio superior un tapón, unido por un tubo plástico a un recipiente que contiene solución salina.

La resina de la columna se lava durante 10-15 minutos antes de aplicar la muestra, para que las partículas de Sephadex G-100 estén bien compactadas.

Solución de Drabkin (VKZ)

Procedimiento

Se toma 1 ml de plasma o suero (muestra) y se le añaden 40 μl de un hemolizado de 10 g/dl. La mezcla se deja reaccionar por cinco minutos a temperatura ambiente y luego se le añaden 5 mg de sacarosa y se disuelve (la sacarosa aumenta la densidad del plasma).

Esta mezcla se coloca con mucho cuidado en la parte superior de la columna de Sephadex, para no mover la resina. Se deja fluir la columna hasta que se introduzca toda la muestra en la resina. Luego, se conecta la columna con el recipiente que contiene la solución salina y se comienza el flujo. Al pasar por la columna, el complejo Hb-Hp y la hemoglobina en exceso se separan. Cuando el complejo Hb-Hp está situado cerca de la salida, se coloca un balón aforado de 25 ml con 2 ml de Drabkin, llevándose al aforo con el eluido (complejo Hb-Hp). Este volumen contiene la fracción donde se eluye el complejo Hb-Hp. Posteriormente, se lee la densidad óptica (DO) en el espectrofotómetro, a una longitud de onda de 418 nm contra un blanco (25 ml de solución salina más 2 ml de solución Drabkin o Van Kampen).

Al mismo tiempo, se continúa el flujo por la columna hasta que sale la hemoglobina en exceso, la cual se desecha y se lava con salina. De tal forma, la columna

queda lista para ser utilizada de nuevo.

Esta técnica expresa los niveles de haptoglobina plasmática, en términos de su capacidad de unión con la hemoglobina.

Los cálculos se realizan utilizando la fórmula siguiente:

$\text{DO} \times \text{V} \times 0,143 \times 100 = \text{capacidad de unión de la Hp a la Hb (mg/dl plasma)}$.

Donde:

DO = densidad óptica de la muestra a 418 nm.

V = volumen de la muestra en ml.

0,143 = constante que se calcula a partir del coeficiente de extinción molar de la cianometahemoglobina a 418 nm.

100 = factor de conversión a mg/dl. Si el volumen es 25 ml, el factor es 359,5.

VN = 50-150 mg/dl (CIHATA).

INTERPRETACIÓN DEL NIVEL SÉRICO DE HAPTOGLOBINAS

La función vital de las haptoglobinas consiste en unirse con la hemoglobina para evitar la pérdida de hierro por vía urinaria. Sus niveles de referencia van de 40 a 120 mg/dl y las variaciones normales para los tres fenotipos de haptoglobinas son aparentemente distintas, obteniéndose los valores más altos en los sujetos Hp 1-1. En general, no existen diferencias significativas entre varones y mujeres, y por regla, no se encuentran haptoglobinas detectables en los recién nacidos.

En la mayoría de los casos, los niveles bajos de Hp se deben a hemólisis y a un rápido aclaramiento del complejo Hb-Hp. Valores muy bajos pueden ser generados por una reducción de la sobrevida eritrocítica a la mitad de lo normal o por una eritropoyesis ineficaz.

Al respecto, cabe destacar que las causas más comunes de bajos niveles de haptoglobinas séricas en condiciones patológicas, se deben a un incremento de su catabolismo, que puede ser el resultado de un aumento de la hemólisis de los eritrocitos circulantes o de una destrucción aumentada de sus precursores nucleados en médula ósea, como es característico en la eritropoyesis ineficaz.

Específicamente, en anemias hemolíticas la disminución de las haptoglobinas séricas se hace evidente cuando la vida media ($t/2$) de los eritrocitos marcados

con Cr^{51} es inferior a los 23 días; esto demuestra que cuando la $t/2$ es de 17 días o menos, la haptoglobina se encuentra virtualmente ausente del suero.

Los niveles bajos de haptoglobinas después del primer año de vida son casi siempre de significado clínico. En el caso de los caucásicos, la ausencia o bajos niveles de Hp tras el primer año de vida indican hemólisis o daño hepatocelular agudo. Es importante recordar que hay situaciones genéticamente determinadas de hipo y ahaptoglobinemias, que pueden encontrarse en algunas poblaciones.

Tanto en condiciones de hemólisis intravascular como extravascular, las haptoglobinas se encuentran disminuidas o ausentes. Por ende, su determinación no ayuda a diferenciar estas condiciones, ni la severidad del cuadro hemolítico, ya que sus niveles no tienen ninguna relación con esto.

Valores altos de Hp suelen asociarse con infección, inflamación, enfermedades granulomatosas, neoplasia y terapia esteroide. Dichos incrementos se relacionan frecuentemente con aumentos en el índice de eritrosedimentación, aunque tales proteínas por sí solas no son las únicas responsables de esa alteración.

En las enfermedades hepáticas, los niveles de haptoglobinas son variables; por ejemplo, en la cirrosis y en la hepatitis crónica los niveles suelen ser bajos, lo cual puede deberse a hemólisis, disminución de la síntesis de haptoglobinas o a un incremento en los niveles de estrógenos. En enfermedades hepatocelulares también se reportan valores bajos, mientras que en la obstrucción biliar y en carcinosarcomas secundarios los niveles se encuentran altos.

En presencia de cáncer, inflamación, infección o bajo terapia esteroide, las haptoglobinas pueden o no estar aumentadas; aunque es muy común que se dé una elevación de estas, lo cual puede enmascarar el efecto de una hemólisis incrementada.

En drepanocitosis, esferocitosis hereditaria, enfermedad por S-Tal y hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN), se han determinado valores de 0 mg/dl de haptoglobinas; mientras que en artritis reumatoide, LED e infecciones se han encontrado niveles incrementados de más de 200 mg/dl.

Según investigaciones realizadas, individuos AS, con talasemia menor o deficientes en G6PD (GdA-), suelen presentar valores normales.

Por otra parte, en vista de que la haptoglobina se une específicamente a la Hb cuando hay hemólisis intravascular, existe una relación directa entre la capacidad

de conjugación del suero con la Hb y la aparición de la Hb en la orina. Se sabe que la hemoglobinuria ocurre solo cuando la concentración de Hb plasmática excede los 10 mg/dl, lo que quiere decir que el hallazgo de Hb en orina sucede tras saturarse la capacidad de combinación de la haptoglobina con la Hb.

Aunque la permeabilidad de los glomérulos a la Hb libre es relativamente baja, es bastante mayor que para la albúmina y otras proteínas de peso molecular similar. Esto se explica, en parte, por el hecho de que la hemoglobina tiende a disociarse en dímeros alfa-beta al pH fisiológico del plasma. Se ha demostrado que la masa de Hb filtrada por los glomérulos en la mayoría de los desórdenes clínicos que cursan con hemoglobinuria, es reabsorbida hacia el plasma para su reutilización, al igual que la globina y la protoporfirina; por esto, las células de los tubos proximales recuerdan al sistema reticulohistiocitario (SMF), en cuanto a su habilidad para conservar el hierro de la hemoglobina.

Como la concentración plasmática de las haptoglobinas es de $0,1 \pm 0,04$ g/dl, aproximadamente 100 mg de hemoglobina son unidos por la haptoglobina de 100 ml de plasma. El complejo Hb-Hp que se forma tiene un gran peso molecular, por lo que no es filtrado por el riñón; este es eliminado rápidamente del plasma por el sistema macrofágico, sobre todo del hígado, donde la enzima heme-alfa-metenil oxigenasa degrada la hemoglobina de su combinación con la haptoglobina, por lo que la hemoglobina se cataliza de la manera usual. Cuando la hemólisis intravascular continúa por largos periodos o la cantidad de Hb libre llega a ser bastante en un momento determinado, la capacidad de combinación de las haptoglobinas se ve excedida; aparece Hb libre en la orina y, por ende, en el plasma, siendo esta última más rápidamente depurada que el complejo Hp-Hb.

Cabe mencionar que la masa de haptoglobina sintetizada por día es constante, independientemente de su grado de remoción, lo que indica que el hígado no incrementa su síntesis en respuesta a bajas concentraciones de la proteína, ni aun bajo presencia de Hb libre.

En ciertas ocasiones en que no hay haptoglobinas disponibles, una globulina beta denominada hemopexina, puede combinarse con Hb. Cuando se satura la capacidad de conjugación de la hemopexina, el exceso de heme se une con la albúmina para formar un compuesto denominado metahemalbúmina.

DETERMINACIÓN DE Hb EN PLASMA (Método Crosby y Furth)

La acción catalítica de las proteínas que contienen el

grupo heme, produce una oxidación de la bencidina por el H_2O_2 , lo cual da un color verdoso que cambia a azul y luego a rojo-violeta. La intensidad de color se puede comparar en un espectrofotómetro con el color que producen las soluciones de Hb de concentración conocida.

Se debe evitar a toda costa la hemólisis durante la recolección y manipulación de la sangre.

La sangre obtenida se mezcla con citrato sódico de 3,8 g/dl en proporciones de 9:1, respectivamente.

Reactivos

Bencidina al 1%

Bencidina básica	1 g
Ácido acético glacial	90 ml
Agua destilada c.s.p.	100 ml
Se conserva bien por varias semanas en botella oscura y a 4 °C.	

Peróxido de hidrógeno al 1%

Un volumen de H_2O_2 (30%) ("10 volúmenes") se diluye con dos volúmenes de agua. Se prepara al momento del uso, ya que es inestable.

Tubo	ml de bencidina	ml de plasma μ orina	ml de solución patrón de Hb
Patrón	1	-	0,02
Desconocido	1	0,02	-
Blanco	1	-	-

- Se agrega a cada tubo 1 ml de H_2O_2 . Se mezcla por inversión y se deja en reposo por 20 minutos.
- Se añaden 10 ml del diluyente a cada tubo y se deja en reposo durante diez minutos.
- Se lee la DO a 515-630 nm contra el blanco.
- Cálculo:

$$\text{mg Hb/dl} = \frac{\text{DO muestra}}{\text{DO patrón}} \times 20.$$

Notas:

- Si el contenido de hemoglobina plasmática del paciente en estudio es anormalmente alto, el plasma se debe diluir hasta que presente solo una leve co-

Patrón de Hb de 20 mg/dl

Se puede preparar por dos opciones:

- A partir de un hemolizado control (HEMO-UCR) de concentración conocida (10 g/dl), se prepara la dilución correspondiente.
- Usar una solución estándar de cianometahemoglobina como fuente de Hb para preparar el patrón. Por ejemplo, el estándar de calibración CIANO-UCR (± 80 mg/dl) diluido 1:4 con agua destilada (± 20 mg/dl).

Diluyente

Ácido acético al 10%	
Ácido acético glacial	10 ml
Agua destilada c.s.p.	100 ml
Se conserva varios meses a 4 °C.	

Método

- Los siguientes reactivos se agregan a tres tubos grandes de ensayo y se mezclan:

loración. Ligeras modificaciones al método incluyen el uso de o-toluidina o de o-dianisidina, en vez de bencidina.

- La cristalería debe estar escrupulosamente limpia, para evitar residuos de hemoglobina que afecten los resultados.

Valores normales

De 1 a 4 mg de Hb/dl de plasma.

Interpretación

La Hb plasmática se encuentra elevada en aquellas anemias hemolíticas en las que la hemólisis se produce sobre todo en el torrente circulatorio (hemólisis intravascular).

Hemoglobinemia marcada con o sin hemoglobinuria se encuentra típicamente en la HPN, durante las crisis hemolíticas por deficiencia de la G6PD y de Hbs inestables, en las reacciones transfusionales, en la hemoglobinuria paroxística al frío, en el síndrome de aglutininas frías, en infección por *P. Falciparum* y *C. Welchii*, en la hemoglobinuria de la marcha y en otras condiciones asociadas a trauma mecánico de los eritrocitos. Hemoglobinemia de menor proporción se presenta en las anemias hemolíticas autoinmunes por anticuerpos calientes, en anemia drepanocítica y en la talasemia mayor.

En la esferocitosis hereditaria y otras anemias hemolíticas extravasculares, en donde la destrucción se produce predominantemente en el bazo, la concentración de Hb en el plasma es normal o solo ligeramente aumentada.

DETERMINACIÓN DE METAHEMOGLOBINA (Método de Evelyn y Malloy)

Principio

La metahemoglobina es un tipo de Hb en la que el ión ferroso ha sido oxidado al estado férrico; tiene la máxima absorción a 630 nm. Cuando se añade cianuro, esta banda de absorción desaparece y el cambio resultante en la densidad óptica es directamente proporcional a la concentración de metahemoglobina. La totalidad de la hemoglobina de la muestra se mide después de la conversión completa a HiCN, por la adición del reactivo de Drabkin modificado. La conversión medirá hemoglobina (HbO₂) y metahemoglobina, pero no sulfohemoglobina. Así, la presencia de una cantidad importante de sulfohemoglobina proporcionará una medición erróneamente baja del total de hemoglobina. La turbidez del hemolizado puede evitarse con la adición de un detergente no iónico.

Reactivos

- Tampón de fosfatos 0,1 M, pH 6.8: se pesan 13,6 g de K H₂P0₄ y se llevan a un litro. Para obtener el pH 6.8, se prepara aparte una solución de Na₂HPO₄ 0,1M (14,196 g/L), la cual se añadirá lentamente a la solución de K H₂P0₄ hasta llegar al pH requerido.
- Solución de cianuro de potasio al 5%: se disuelven 5 g de KCN en 100 ml de agua.
- KCN neutralizado: se añade medio volumen de ácido acético al 12% (12 ml de ácido acético glacial se llevan a 100 ml con agua destilada) a un volumen de KCN al 5%.
- Solución de ferricianuro de potasio (K₃FeCN₆) de 5 g/dl.
- Detergente no iónico: Sterox SE, Nodidet P40 o Tritón X-100; ambos al 1% (10 ml/L).

Método

Se lisan 0,2 ml de sangre en una solución que contenga 4 ml de tampón y 6 ml de la solución detergente. El hemolizado se divide en dos partes iguales (A y B). La absorción de A se mide en un espectrofotómetro a 630 nm (A1) contra una mezcla (4:6) del tampón y del detergente. Al mismo tubo se le añade una gota de solución de cianuro potásico neutralizado (conversión de la metaHb nativa en cianometahb), a la vez que se mide de nuevo la densidad óptica después de la mezcla (A2). La variación de la A es proporcional a la cantidad existente de metaHb. Se añade a B una gota de solución de ferricianuro potásico (conversión de toda la Hb a metaHb) y se mide la densidad óptica después de cinco minutos y en la misma longitud de onda (A3). Posteriormente, se añade a B una gota de solución de cianuro potásico (conversión de toda la metaHb en cianometahb), se mezcla y se hace una nueva lectura (A4). Todas las mediciones se hacen frente a un blanco de tampón y detergente, en la misma proporción que está en la muestra.

Cálculo

$$\text{Metahemoglobina (\%)} = \frac{A_1 - A_2}{A_3 - A_4} \times 100$$

Valores normales = menos de 2%.

Observaciones

- La metahemoglobina es incapaz de combinarse o de transportar O₂. En los eritrocitos se forma continuamente una pequeña cantidad de metahemoglobina, que es reducida por los sistemas enzimáticos (NADH-reductasa de la metahemoglobina del ciclo de Embden-Meyerhof).
- Las cubetas usadas deben ser de alta precisión y estar escrupulosamente limpias. La turbiedad causa error en la determinación de la hemoglobina; aunque no afecta los valores de la metahemoglobina. Si la muestra de sangre es lipémica se miden volúmenes de células y plasma, se lavan las células con solución salina y se resuspenden exactamente a su volumen original con solución salina fisiológica.
- En el período neonatal es frecuente encontrar niveles ligeramente más altos que en adultos.
- El método no es seguro para valores bajos de metahemoglobina, puesto que resultados de 0,2% corresponden a una diferencia de absorbancia de alrededor de 0,009.

- Con esta técnica no se valora la sulfoHb, por lo que si esta se halla presente en cantidad apreciable, la lectura de la Hb total será baja.

Causas de metahemoglobinemia

Los estados clínicos asociados con metahemoglobinemia son de dos tipos: adquiridos y hereditarios.

Adquiridos

Los individuos sanos pueden desarrollar metahemoglobinemia tras la exposición a agentes que aceleran la formación de metahemoglobina, excediendo la capacidad del sistema fisiológico reductor de la metahemoglobinemia. Entre estos agentes figuran: nitratos de agua de manantial, que son reducidos a nitritos por la flora intestinal; nitritos empleados como conservadores de carnes; algunos colorantes y el fármaco acetanilida.

Las concentraciones de 20% a 30% de metahemoglobina provocan cianosis, pero no requieren tratamiento. Concentraciones superiores pueden causar estupor e incluso, muerte por anoxia.

La inyección intravenosa de 1 a 2 mg de azul de metileno por kilogramo de peso corporal corregirá rápidamente la metahemoglobina, al activar el sistema reductor ligado al NADPH. En ocasiones, se necesitará repetir las dosis hasta eliminar el agente causal del trastorno.

Hereditarios

- Déficit hereditario de reductasa de la NADH-

metahemoglobina (diaforasa): el individuo homocigoto presenta un grave déficit de la enzima que da lugar a metahemoglobinemia persistente, con una característica cianosis de un gris pizarroso. En general, no se encuentra otro signo de enfermedad, aunque en una minoría de pacientes se acompaña de retardo mental profundo y otros hallazgos neurológicos graves. La sangre contiene del 20% al 45% de metahemoglobina. La terapéutica solo tiene un efecto estético y consiste en la ingestión diaria de azul de metileno o de grandes dosis de ácido ascórbico. El heterocigoto no suele presentar metahemoglobinemia, pero esta puede desarrollarse tras la toma de fármacos oxidantes que no provocan metahemoglobinemia importante en los individuos sanos. Por ejemplo, se comprobó que la combinación de fármacos utilizados de forma profiláctica contra el paludismo en Vietnam, ocasionaba metahemoglobinemia en los heterocigotos.

- Hemoglobinas M: en este grupo de nueve hemoglobinas anormales, por lo general una sustitución de un aminoácido en la cadena alfa o en la beta en la región de fijación del heme da lugar a una metahemoglobina anormalmente estable. Se cree que la homocigosis para la HbM es fatal. Los heterocigotos poseen alrededor del 20% al 30% de metahemoglobina y son asintomáticos, excepto por la cianosis.
- Hbs inestables (ejemplo: I-Toulouse) o con muy baja afinidad por el O₂ (Hb Kansas).

El diagnóstico diferencial de la metahemoglobinemia se presenta en el Cuadro N° 2.

Cuadro N° 2. Diagnóstico diferencial de la metahemoglobina crónica			
	Toxicidad por drogas (Hbs inestables)	Deficiencia de la diaforasa	HbM
Hallazgos hematológicos	Hemólisis crónica por cuerpos de Heinz	Ninguno	Ninguno
Porcentaje de MetaHb	Variable	Variable	25-40%
Espectro de la metaHb	Como el de la metaHb A	Como el de la metaHb A	Específico para el tipo de HbM
Electroforesis de la Hb*	Igual que Hb A (si es por drogas)	Igual que Hb A	Hb A + Hb M
Estudio de enzimas	Actividad normal	Deficiencia de diaforasa I o diaforasa II	Actividad normal

* Electroforesis del hemolizado a pH 7.1, luego de la conversión a metaHb (Hi).

PRUEBA PARA DIFERENCIAR HEMOGLOBINA Y MIOGLOBINA EN ORINA

Orina de color oscuro, tipo "Coca Cola", se puede presentar en pacientes con enfermedad hemolítica y miolítica; por lo tanto, es necesario excluir la presencia de eritrocitos mediante un examen microscópico de la orina, así como demostrar la presencia de pigmentos heme. Si estos se encuentran y el curso clínico no indica claramente la presencia de una u otra alteración, es esencial hacer la diferenciación entre Hb y mioglobina.

Principio

Tanto la Hb como la mioglobina se pueden detectar por medio de la bencidina o la o-tolidina y el peróxido de hidrógeno.

La mioglobina tiene un peso molecular menor que la Hb, por lo que es soluble en solución de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 80%, mientras que la Hb no lo es. Además, cada una de ellas tiene propiedades electroforéticas y espectrofotométricas que permiten diferenciarlas.

Es necesario determinar si el pigmento presente es una proteína, para lo cual se añade a la muestra de orina una solución de ácido sulfosalicílico al 3%. Si hay precipitación, el pigmento es una proteína; de lo contrario, si el filtrado retiene su color original, es un pigmento no proteico, quizá una porfirina.

Reactivos

- a. O-tolidina al 1% (este reactivo es muy estable)

O-tolidina	1 g
Metanol absoluto c.s.p.	100 ml

- b. Peróxido ácido

Ácido acético glacial	50 ml
H_2O_2 al 3%	100 ml
La mezcla anterior se debe hacer con cuidado	

- c.

Ácido sulfosalicílico	3 ml
Agua destilada c.s.p.	100 ml

- d. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ anhidro

Procedimiento

- Demostrar si el color oscuro de la orina se debe a la presencia de Hb o mioglobina o a otros pigmentos como porfirinas:
 - Se añaden y mezclan 3 ml de ácido sulfosalicílico a 1 ml de orina. Si el filtrado retiene su color original, se está ante la presencia de un pigmento no proteico, tal vez porfirina.
- Demostración de pigmentos heme:
 - Se agregan cuatro gotas de orina, dos gotas de ortolidina y tres de peróxido ácido (en ese orden). Si hay cantidades significativas de cualquiera de los pigmentos, aparece rápidamente un color azul o verdoso.
- Solubilidad diferencial con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (diferenciación presuntiva):
 - Se filtra o centrifuga la orina.
 - Se añaden 2,8 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de 80%. Se mezcla bien hasta la disolución del sulfato de amonio y se deja en reposo por cinco minutos.
 - Se filtra y analiza si el filtrado presenta pigmentos heme. Si los hay, la muestra contiene mioglobina, de lo contrario, el pigmento es Hb, la cual precipita con el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 80% y, por tanto, aparece el precipitado coloreado.

Es importante realizar estos análisis en orina fresca, ya que la mioglobina desnaturalizada precipita con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 80%.

Diferenciación por electroforesis

La hemoglobina de la orina presenta la misma movilidad electroforética que la hemoglobina del paciente, mientras que la mioglobina urinaria tiene una migración más lenta, igual que la hemoglobina C. Si el paciente tiene HbC no podrá distinguirse la hemoglobinuria de la mioglobinuria por este método. Tampoco podrá utilizarse este método para distinguir hemoglobinemia de mioglobinemia, ya que la hemoglobina libre unida a las haptoglobinas tiene la misma movilidad electroforética que la mioglobina libre.

El procedimiento de este método es similar al que se utiliza para la electroforesis de hemoglobina; la diferencia es que usa orina, la cual, según la concentración de pigmentos heme que posea, se puede concentrar empleando membranas de colodión. La identificación de las bandas se puede hacer tal y como se consigna para las haptoglobinas séricas.

BIBLIOGRAFÍA

Atmetlla F, Sáenz GF, Jiménez J. Estimación cuantitativa de haptoglobinas séricas en adultos normales de ambos sexos. *Acta Med Costarric* 1972; 15(3): 175-188.

Chaves M, Sáenz GF, Montero A, Jiménez J, Salgado M. Cuantificación de haptoglobinas séricas por un método modificado de peroxidación. *Rev Costarric Cienc Méd* 1982; 3(2): 135-148.

Gené M, Huguet E, March M, Medallo J, Gil P, Carracedo A, *et al.* Estudio del polimorfismo de la haptoglobina mediante sistemas automatizados en geles miniatura. En: Romero JL, Arufe MI, Gamero JJ, Vizcaya MA (editores). IV Jornadas Anuales Sociedad Española Medicina Legal y Forense. Cádiz: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Cádiz; 1990.

Lewis SM, Roper D. Laboratory methods used in the investigation of haemolytic anaemias. En: Lewis SM, Bain J, Bates I. *Dacie and Lewis practical haematology*. 10 ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2006. p. 188-203.

Lionetti FJ, Valeri CR, Bond JC, Fortier NL. Measurement of hemoglobin binding capacity of human serum or plasma by means of dextran gels. *J Lab Clin Med* 1964; 64: 519-528.

Rodríguez WE, Sáenz GF, Carazo M. Estudio analítico de hemólisis. En: Sáenz GF (editor). *Hematología analítica*. 5 ed. San José: EDNASSS; 2008. p. 625-636.

Vasudevan DM, Sreekumari S, Kannan V. *Texto de bioquímica*. 6 ed. México: Editorial Cuéllar Ayala; 2011.

ESTUDIOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE HEMOGLOBINURIA PAROXÍSTICA NOCTURNA

Dr. Walter E. Rodríguez Romero
Dr. German F. Sáenz Renauld

INTRODUCCIÓN

La hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN) es un trastorno raro, pero importante, producto de una enfermedad mutacional de la célula germinativa pluripotencial (UFC-LM) o de la mielopoyética (UFC-GEMM). Los eritrocitos de los enfermos son anormalmente sensibles a la hemólisis por constituyentes del complemento. La sensibilidad al complemento también se observa en leucocitos, plaquetas y elementos medulares, incluyendo las células germinales (UFB-E, UFC-E y UFC-GM).

Esta enfermedad -que puede ser primaria o secundaria- se diagnostica por medio de varias pruebas sencillas. Su diagnóstico no es difícil en el paciente clásico, que presenta hemoglobinuria evidente en las primeras horas de la mañana, la cual desaparece en el transcurso del día. Sin embargo, muchos pacientes presentan cuadros clínicos confusos, que incluyen complicaciones trombóticas, reacciones transfusionales inexplicables y "citopenias refractarias" con hipoplasia medular o deficiencia de hierro. Por lo tanto, es necesario poseer una prueba de escrutinio simple, como la de inulina, cuando se sospecha un diagnóstico de HPN.

El clono de HPN también se ha descrito en casos de mielofibrosis y más raro aún, de anemia sideroblástica y otros síndromes mielodisplásicos, así como en leucemia aguda. Se ha determinado que existe un riesgo mayor de desarrollar HPN (un 20-30% más) en sujetos que han presentado un cuadro de anemia aplásica.

Por lo general, en la HPN hay hemopoyesis ineficaz, la cual suele reflejarse con macrocitosis (en ausencia de incremento de reticulocitos) y con coeficientes de variación del volumen de glóbulos rojos incrementados.

El trastorno es propio de la edad adulta mayor, aunque se han descrito casos en adolescentes y niños. La fisiopatología de la enfermedad se ha asociado a una deficiencia a nivel del receptor GPI (glicosilfosfatidilinositol) y de diversas proteínas ligadas a este, como la CD 55 y 59, que participan en la vía del complemento. Específicamente, se ha identificado la mutación a nivel del gene PIGA que codifica para el GPI.

PRUEBA DE LA INULINA (Método de Brubaker et al)

Principio

Se presenta un incremento de lisis en eritrocitos complemento sensibles, cuando este es activado por anticuerpos específicos o por la vía de activación alterna del complemento. La inulina, y otras sustancias, activan el proactivador C_3 del complemento y este desencadena la activación de los otros componentes del complemento. La lisis de las células HPN es un indicador de estas reacciones.

Reactivo

Inulina	1,0 g
Solución salina al 0,85%	10 ml
Mantener en refrigeración	

Método

1. Se marcan dos tubos de ensayo de 12 x 75 mm como C.I. (con inulina) y S.I. (sin inulina).
2. Se agrega una gota de la solución de inulina al tubo C.I.
3. Se añaden 3 ml de sangre a cada tubo, al momento en que se obtiene la muestra. Se mezcla bien por inversión.
4. Se colocan ambos tubos a 37 °C durante 30-45 minutos, hasta que se haga evidente la retracción del coágulo.
5. Se centrifuga a 1.500 g por cinco minutos y se observa si el suero presenta hemólisis.

Interpretación

Si hay hemólisis en el tubo que contiene inulina (C.I.) y no la hay en el tubo control (S.I.), la prueba se considera positiva.

Si el tubo control (S.I.) presenta hemólisis, se deben considerar varios posibles diagnósticos de hemólisis intravascular o error técnico.

La muestra se puede tomar sin anticoagulante (con jeringa) y verter la sangre antes que se forme el coágulo a un tubo y añadir la inulina. También se utiliza el citrato de sodio, ya que disminuye la hemólisis.

PRUEBAS PRESUNTIVAS Y CONFIRMATORIAS DE LA LISIS POR SACAROSA (Métodos de Hartmann y Jenkins)

Prueba presuntiva N° 1

Reactivo

Solución de sacarosa al 10% de un pH aproximado de 7.4

Sacarosa (azúcar comercial granulado)	10 g
Agua destilada c.s.p.	100 ml

Sangre total citratada, una parte de citrato de sodio 3,8% por nueve partes de sangre total. También puede usarse sangre desfibrinada. Al mismo tiempo, se debe obtener una muestra de sangre testigo normal.

Método

1. Se adiciona 0,1 ml de sangre a 0,9 ml de solución de sacarosa al 10% (preparada antes de la prueba). Se mezcla bien por inversión cuidadosa.
2. Se deja en reposo a temperatura ambiente por 30 minutos.
3. Se centrifuga y se observa si hay hemólisis.

Si esta prueba da un resultado positivo, se debe efectuar la prueba presuntiva N° 2 (o la confirmatoria), por cuanto en forma ocasional se han reportado algunos casos de falsos positivos, aunque nunca de falsos negativos.

Para esta prueba de tamizaje no se puede usar sangre con heparina o EDTA. Antes de comenzar la prueba es aconsejable centrifugar una pequeña cantidad de sangre testigo y problema, para asegurarse que la hemólisis no se produce como resultado de una punción venosa incorrecta.

Prueba presuntiva N° 2

Reactivos

- Solución de sacarosa isotónica: se disuelven 92,4 g de sacarosa G.R. en 910 ml de solución de fosfato de sodio 0,005 M (monobásico) y 90 ml de solución de fosfato de sodio 0,005 M (dibásico). Se comprueba el pH y se ajusta a 6.1, si fuera necesario.

Método

1. Se obtiene sangre venosa del paciente y de un donador normal. Se deja coagular por 30 minutos. Se centrifuga y se separa el suero.
1. A partir del coágulo, se prepara una suspensión al 50% de eritrocitos.
2. En tubos separados, se añaden 0,85 ml de la solución de sacarosa, 0,05 ml del suero autólogo y 0,1 ml de la correspondiente suspensión de eritrocitos. Se mezcla bien por inversión.
3. Los tubos (paciente y control) son incubados por 30 minutos a 37 °C. Luego se centrifuga y se observa el sobrenadante por hemólisis.

Resultados

Se observará marcada hemólisis en HPN, pero no en el control. De acuerdo con los autores, no se observará hemólisis en otros tipos de anemia hemolítica (enfermedad por aglutininas frías, anemia hemolítica autoinmune, esferocitosis hereditaria, deficiencia de piruvato quinasa, acantocitosis y hemoglobinopatías).

PRUEBA DE SUERO ACIDIFICADO PARA HPN (Método de Ham)

Los eritrocitos de pacientes con HPN son lisados cuando se colocan en suero acidificado (pH 6.5-7.0). Los eritrocitos normales no se lisan en estas condiciones.

Reactivo

Ácido clorhídrico	0,2 N

Método

1. Se obtienen 10 ml de sangre y se desfibrina. Luego se centrifuga a 2.000 g por cinco minutos. Se guarda el suero y se lavan los eritrocitos tres veces con solución salina al 0,85%. Las células deben ser resuspendidas en cada lavada.
2. Se hace una suspensión al 50% de eritrocitos en solución salina al 0,85%.
3. Se obtienen 10 ml de sangre de un individuo normal y del mismo grupo ABO.
4. La sangre normal se trata en la misma forma que en a y b.
5. Se marcan 5 tubos 12 x 75 mm, numerados del 1 al 5.
6. Se añaden 0,5 ml del suero del paciente a los tubos 1 y 2. Luego, 0,5 ml del suero normal compatible (ABO) a los tubos 3, 4 y 5.
7. Se añaden 0,5 ml de HCl 0,2 N a los tubos 1, 3 y 5.
8. Se agrega una gota (0,05 ml) de la suspensión al 50% de eritrocitos del paciente a los tubos 1, 2, 3 y 4.

9. Se añade una gota de la suspensión al 50% de los eritrocitos del control normal al tubo 5.
10. Los tubos se mezclan suavemente, se tapan bien y se incuban por una hora a 37 °C.
11. Se centrifugan y se observa el sobrenadante por hemólisis.

Resultados

Un resultado positivo mostrará lisis en las muestras con suero acidificado (tubos 1 y 3), escasez o ausencia de hemólisis en suero no acidificado (tubos 2 y 4) y ausencia de lisis en suero fresco (control) acidificado y eritrocitos normales (tubo 5).

Comentarios sobre la prueba

Una prueba falsa positiva se ve en ocasiones en la esferocitosis hereditaria o si el tubo 5 muestra hemólisis. Si esto se sospecha, debe repetirse la prueba, usándose suero acidificado, previamente inactivado a 56 °C por 30 minutos. Como los eritrocitos HPN requieren complemento para su hemólisis, esta prueba modificada sería negativa en HPN y permanecería positiva en caso de esferocitosis. Esta prueba de Ham también se ve positiva en la variedad de anemia diseritropoyética hereditaria tipo HEMPAS, pero en esta enfermedad los eritrocitos son lisados por el suero acidificado del propio paciente.

Las células HPN son sumamente susceptibles a la hemólisis por autoanticuerpos e isoanticuerpos, por lo que pueden ser útiles en la selección de anticuerpos hemolíticos.

Otras pruebas de laboratorio

En laboratorios especializados, como métodos confirmatorios se pueden determinar marcadores inmunológicos por citometría de flujo. Se utilizan anticuerpos anti CD 59 y CD 55, entre otros (anti CD 14, anti CD, 16), y se pueden determinar en eritrocitos, en granulocitos y en monocitos.

Otra técnica adicional que debe realizarse en conjunto con los anticuerpos monoclonales, es la prueba de la aerolisina (FLAER: aerolisina marcada con fluoresceína). Los clones HPN positivos son resistentes a la lisis por la aerolisina, ya que esta enzima se une al receptor GPI. Las células normales que poseen el receptor son destruidas. Esta determinación es muy efectiva para detectar pequeñas poblaciones de células HPN.

BIBLIOGRAFÍA

Bain B, Win N. Acquired haemolytic anaemias. En: Lewis SM, Bain B, Bates I. Dacie and Lewis practical haematology. 10 ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2006. p. 239-270.

Brodsky R. Advances in the diagnosis and therapy of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Blood Rev 2009; 22(2): 65-74.

Brodsky R. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. En: Hoffman R, Benz E, Silberstein L, Heslop H, Weitz J, Anastasi J. Hematology basic principles and practice. 6 ed. Canadá: Elsevier Saunders; 2013. p. 373-381.

Brubaker LH, Schaberg DR, Jefferson DH, Mengel CE. A potencial rapid screening test for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. N Engl J Med 1973; 288(20): 1059-1060.

Góngora-Biachi R, González-Martínez P, Ceballos-López A, Rivas-Llamas, JR, Rico-Curiel E, Aquino-Salgado JL, *et al.* Consenso mexicano para el tratamiento de la hemoglobinuria paroxística nocturna. Rev Hematol Mex 2015; 16: 70-96.

Ham TH. Chronic hemolytic anemia with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Arch Intern Med 1939; 64(6): 1271-1305.

Ham TH. Chronic hemolytic anemia with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria - study of the mechanism of hemolysis in relation to acid-base equilibrium. N Engl J Med 1937; 217: 915-917.

Hartmann BC, Jenkins DE. The "sugar-water" test paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. N Engl J Med 1966; 275(3): 155-157.

Hartmann BC, Jenkins DE, Arnold AB. Diagnostic specificity of sucrose hemolysis test for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Blood 1970; 35(4): 462-475.

Sáenz GF, Rodríguez WE. Pruebas de laboratorio para el diagnóstico de HPN. En Sáenz GF. Hematología Analítica. 4 ed. San José, Costa Rica: EDNASSS; 2003. p. 317-322.

Sirchia G, Marubini E, Mercuriali F, Ferrone S. Study of two in vitro diagnostic test for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Brith J Hemat 1973; 24(6): 751-759.

Wang SA, Pozdnyakova O, Jorgensen J, Medeiros J, Stachurski D, Anderson M, *et al.* Detection of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clone in patients with myelodysplastic syndromes and related bone marrow diseases, with emphasis on diagnostic pitfalls and caveats. Haematologica 2009; 94(1): 29-37.

PRUEBAS PARA DETECCIÓN DE MEMBRANOPATÍAS Y OTROS DEFECTOS INTERCORPUSCULARES: FRAGILIDAD OSMÓTICA Y AUTOHEMÓLISIS

Dr. German F. Sáenz Renauld
Dr. Walter E. Rodríguez Romero

INTRODUCCIÓN

El estudio bioquímico de las alteraciones de membrana se fundamenta en la capacidad del eritrocito para resistir lisis osmótica, y de alguna forma, tanto las pruebas de fragilidad osmótica, como las pruebas de lisis con glicerol y la autohemólisis se basan en esta propiedad.

FRAGILIDAD OSMÓTICA

La fragilidad osmótica (FO) es una medida de la resistencia de las células o de la susceptibilidad de estas a la lisis por un estrés osmótico. La habilidad de los eritrocitos normales para soportar la hipotonicidad depende de su forma bicóncava y del exceso de área de superficie respecto a su volumen, lo que les permite aceptar agua hasta 1,8 veces más de su volumen normal, antes de que ocurra lisis osmótica.

Células rígidas, como los esferocitos, presentan una razón área/volumen menor de la normal; por esto se hallan limitados en su habilidad de tomar agua y son muy susceptibles a la lisis osmótica. Al otro lado del espectro, se observan eritrocitos con una razón área/volumen mayor de lo normal (hipocrómicos, codocitos, drepanocitos), lo que les da una mayor resistencia osmótica, o lo que es lo mismo, una FO disminuida.

La prueba llamada “curva de fragilidad osmótica” está diseñada, entonces, para la detección de esferocitos y se realiza en primera instancia al fresco. Cuando la prueba de la FO al fresco no es concluyente, se debe incubar la sangre estérilmente por 24 horas a 37 °C. Si aún así no se obtiene un patrón de hemólisis compatible con el diagnóstico clínico o el presuntivo citológico (esferocitos en sangre periférica), se puede efectuar la prueba de la autohemólisis o realizar las determinaciones de lisis con glicerol.

Estas pruebas de lisis con glicerol también se encuentran diseñadas para la detección de esferocitosis y alteraciones en la relación área de superficie/volumen, y al igual que la FO, aumentan su sensibilidad luego de una incubación por 24 horas, pero a temperatura ambiente.

PRUEBA DE FO COMPLETA (AL FRESCO) PARA EL DIAGNÓSTICO DE ESFEROCITOSIS

(Método de Parpart et al, según Dacie y Lewis)

Reactivos

- a. Solución madre: pH 7.4, osmóticamente equivalente a una solución de:

NaCl al 10%	
Cloruro de sodio	90
Fosfato de sodio dibásico	13,64 g (o, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ = 17,115 g)
Fosfato de sodio monobásico	$2\text{H}_2\text{O}$ = 2,43 g
Agua destilada c.s.p.	1000.00 ml

Si es necesario, se ajusta el pH con hidróxido de sodio 0,15 M. Se guarda en refrigeración en botella ámbar.

- b. Soluciones de trabajo: se diluye la cantidad necesaria de la solución madre a 100 ml, con agua destilada de acuerdo con la tabla siguiente:

% NaCl	mL solución madre
0,10	1,0
0,20	2,0
0,30	3,0
0,35	3,5
0,40	4,0
0,45	4,5
0,50	5,0

% NaCl	mL solución madre
0,55	5,5
0,60	6,0
0,65	6,5
0,70	7,0
0,75	7,5
0,80	8,0
0,85	8,5

Método

En cada uno de los tubos de la serie (0,10-0,85 de NaCl) se colocan 5 ml de cada una de las soluciones respectivas de trabajo. Se adicionan y se mezclan 0,02 ml de sangre anticoagulada (EDTA, heparina, desfri-

brinada). Se deja en reposo a temperatura ambiente por 30 minutos. Se mezcla y centrifuga a 3.000 g por 10 minutos. La absorbancia de cada uno de los sobrenadantes se lee a 540 nm, utilizando como blanco (0% de hemólisis) el sobrenadante del tubo con 0,85% de NaCl (Figura N° 1).

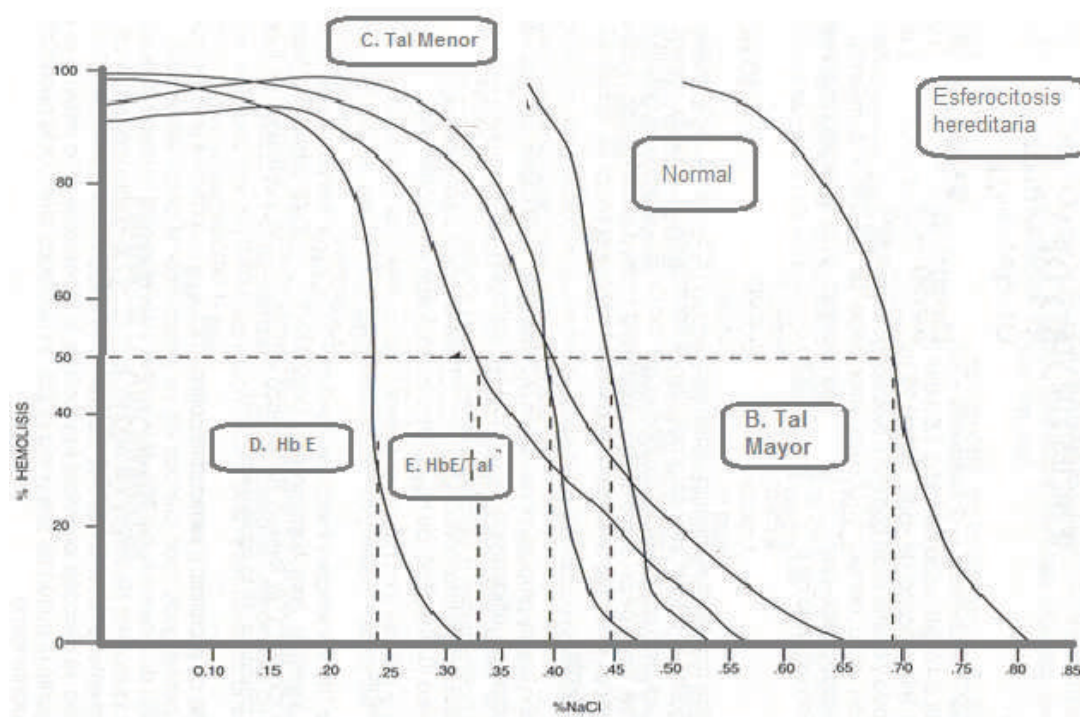


Figura N° 1. Patrones de distintas curvas de fragilidad osmótica (CFO) al fresco.

Cálculo

$$\% \text{ de hemólisis} = \frac{\text{D.O. sobrenadante de cada tubo}}{\text{D.O. sobrenadante del tubo patrón con 100\% de hemólisis (0,10\% de NaCl)}} \times 100$$

Valores esperables de la FO

% NaCl	% de hemólisis
0,10	100
0,20	100
0,30	97-100
0,35	90-99
0,40	50-95
0,45	5-45
0,50	0-6

% NaCl	% de hemólisis
0,55	0
0,60	0
0,65	0
0,70	0
0,75	0
0,80	0
0,85	0

FO post-incubación a 37 °C

- Se obtiene sangre anticoagulada del paciente y se reparte en dos frascos estériles. Se hace lo mismo con un control normal.
- Se incuba a 37 °C por 24 horas.

- Se descarta si hay contaminación.
- Se mide la FO en los mismos términos de la prueba anterior.
- En sangre normal, la hemólisis se inicia en 0,70-0,60%, y es completa entre 0,45-0,35%.

Valores esperables de la FO post-incubación

% NaCl	% de hemólisis
0,10	100
0,20	95-100
0,30	85-100
0,35	75-100
0,40	65-100
0,45	50-95
0,50	40-95

% NaCl	% de hemólisis
0,55	15-70
0,60	0-40
0,65	0-10
0,70	0-5
0,75	0
0,80	0
0,85	0

Significado de las pruebas

La FO de los glóbulos rojos intenta medir la capacidad que tienen los glóbulos rojos para soportar un incremento de su contenido acuoso. Como casi no hay intercambio de cationes durante el relativo corto tiempo de incubación de la prueba, el equilibrio osmótico se realiza por el rápido movimiento de agua a través de la membrana. En la esferocitosis hereditaria (EH) los glóbulos rojos tienen disminuida esa capacidad y hemolizan en presencia de soluciones escasamente hipotónicas; por esto, la clásica curva de la FO (CFO) se halla desplazada a la derecha, y su forma varía según el porcentaje de esferocitos y de microesferocitosis presentes al momento de realizarla.

Con sangre fresca pueden observarse tres tipos de curva:

- *Tipo I:* tiene una morfología similar a la curva normal, pero desplazada a la derecha. La observación

del frotis indica una pequeña proporción de esferocitos.

- *Tipo II:* también desplazada a la derecha, pero con una pequeña prolongación casi horizontal o cola en las concentraciones de NaCl superiores a 0,60%. En los frotis es posible observar una heterogeneidad eritrocítica con presencia de esferocitos "pre-hemolíticos", que serían los que originan la morfología en cola de la curva terminal.
- *Tipo III:* corresponde al tipo severo de FO aumentada, en la que la hemólisis es ya apreciable a concentraciones salinas cercanas a la fisiológica, como reflejo de una alta proporción de esferocitos en los frotis con una FO muy aumentada.

La sensibilidad de esta prueba puede aumentarse considerablemente empleando, como se indicó, sangre incubada a 37 °C por 24 horas. Esta modificación es sobre todo útil para la curva tipo I y para las muestras

que no presentaron al fresco una desviación anormal. Sin embargo, cerca de un 25% de los pacientes tendrá una prueba normal con sangre fresca, en particular los pacientes ligeramente afectados y sus parientes, quienes son los más difíciles de diagnosticar. En contraste, la FO realizada 24 horas después de la incubación de la sangre a 37 °C, es casi siempre positiva (88%), toda vez que las condiciones de la incubación provocan un estrés en los eritrocitos y, por lo tanto, un estímulo del defecto intrínseco.

Si los resultados se reportan como porcentaje de hemólisis (y no se grafica la curva), en la CFO al fresco, en presencia de esferocitos, comienza a apreciarse hemólisis en concentraciones de NaCl entre 0,45% y 0,55%, que son puntos donde en los eritrocitos normales no sufren de lisis o esta es muy poca (Figura N° 1).

PRUEBA PARA DETECTAR FRAGILIDAD OSMÓTICA DISMINUIDA (KATTAMIS *ET AL*) EN TRASTORNOS HIPOCRÓMICOS (TALASÉMICOS) Y EN HEMOGLOBINAS INSOLUBLES

A diferencia de la CFO antes indicada, esta prueba se encuentra diseñada para detectar eritrocitos con resistencia osmótica incrementada, como los codocitos y los mircocitos hipocrómicos, y no para esferocitos

Reactivos

Solución salina tamponada 0,36% (3,6 ml de la solución madre -ver reactivo más adelante- se lleva a volumen final de 100 ml con agua destilada).

Método

Se pipetea en un tubo 13 x 100 mm que contenga 5 ml de la solución tamponada de NaCl al 0,36%, 0,02 ml de sangre total fresca obtenida con anticoagulantes EDTA, heparina o sangre desfibrinada. Se mezcla bien el contenido del tubo. Después de cinco minutos, se mezcla bien de nuevo y se evalúa por visualización el resultado de la prueba, catalogándola como negativa, sospechosa o positiva. Para facilitar la lectura del tubo, este puede colocarse enfrente a una tarjeta que posea una serie de líneas horizontales, con una distancia de 1/2 centímetro entre una y otra. Una FO disminuida (prueba positiva) no permitirá, por la turbiedad, observar las líneas, mientras que una FO negativa sí lo hará.

Esta prueba presuntiva para FO disminuida se puede cuantificar si de forma simultánea con la incógnita se corre el valor de 0% de hemólisis (20 µl de sangre más 5 ml de NaCl 0,85%) y el patrón 100% de hemólisis. Las lecturas se efectúan en espectrofotómetro, usando una longitud de onda de 540 nm. Bajo estas condi-

ciones, el porcentaje de hemólisis se debe interpretar de la siguiente manera:

- *Negativo*: 91-100% de hemólisis.
- *Sospechoso*: 86-90% de hemólisis.
- *Positivo*: menos de 85% de hemólisis.

Comentarios

- Menos de un 5% de los individuos normales dan esta prueba falsa positiva.
- Entre 96% y 100% de las β -tal menores (β^0 , β^+ , $\delta\beta^0$) son detectadas mediante esta prueba. Por ello, se recomienda su uso para detectar este síndrome, además de que es una técnica simple, rápida, de bajo costo y excelente como indicador de la presencia de policitemia microcitica hipocrómica.
- Un 68% de las personas con deficiencia de hierro, cuyos niveles de Hb son menores a 10 g/dl y el FeS menor a 30 µl/dl, también dan esta prueba positiva.
- El 80% de los pacientes con α -tal menor (α^0 -tal) ofrece positividad a la prueba.
- En individuos con HbAE, AC y AS se puede esperar hasta un 80% de positividad, sea FO disminuida.

PRUEBAS DE LA LISIS CON GLICEROL

El fundamento básico de estas pruebas se relaciona con el hecho de que el glicerol, constituyente de diversos tipos de soluciones tampón, retarda el grado de entrada de las moléculas de H₂O a los eritrocitos, por lo que puede medirse el tiempo que toma la lisis osmótica. Aquellos eritrocitos con una razón área de superficie/volumen disminuida, como los esferocitos, resisten por menos tiempo la lisis, en comparación con los eritrocitos normales. Este comportamiento osmótico es común a cualquier tipo de esferocito, independientemente de su etiología.

Dada su efectividad, estas técnicas han resultado muy útiles para la identificación de familiares de pacientes con esferocitosis hereditaria (EH), en quienes los cambios citomorfológicos son poco concluyentes.

Por otra parte, se ha descrito que la hemólisis inducida por el glicerol se relaciona con la proteína de membrana llamada banda 3, encargada del transporte de aniones. Sustancias que bloquean el efecto transportador de dicha proteína, inhiben también el grado de glicerólisis.

Prueba rosada de la glicerólisis ácida (*pink test*), de Vettore *et al*

Las pruebas de lisis con glicerol se desarrollaron para complementar el diagnóstico de la esferocitosis. Se

han desarrollado distintos métodos, de los cuales los dos más utilizados son: la glicerólisis ácida (Zanella) y la prueba rosada o *pink test*, de Vettore. En este capítulo se detalla únicamente la prueba rosada, porque es más fácil de implementar en un laboratorio clínico, que el método de Zanella, que requiere mayor destreza técnica. La otra ventaja de la técnica de Vettore es que se puede montar en forma paralela a la CFO, ya que tiene el mismo tiempo de incubación.

Reactivos

- Solución de bis-tris: bis - (2 hidroxietil) - aminotris (hidroximetil) metano (Sigma), 70 mmol/l (14,6 g/l); azida de sodio, 1,5 mmol/l (0,1 g/l); glicerol al 87% (Merck), 135 mmol/l (11,61 ml), y cloruro de sodio (Fischer) 25 mmol/l (1,46 g/l). Aforar a un litro con agua destilada y ajustar el pH con HCl a 6,66 (rango entre 6,50-6,75). El factor crítico de esta solución es la osmolaridad, cuyo valor debe ser de 290 ± 5 mOsm/L H_2O . Cuando sea necesario, debe ajustarse la osmolaridad con pequeños volúmenes de una solución saturada de cloruro de sodio (al 30%). Se recomienda primero ajustar el pH del tampón y por último, la osmolaridad, cuando apenas falte un pequeño volumen por aforar. La solución se guarda en refrigeración en botella ámbar. Esta es muy estable, tanto de pH como de osmolaridad. Si se utiliza glicerol grado reactivo (Erba), sus cantidades serán 135 mmol/l (12,43 g/l). Con el glicerol Merck se tomará la alícuota correspondiente.
- Solución lisante: preparar una solución al 2% de Tritón X-100 (Sigma) en agua destilada. Esta se guarda en refrigeración, donde es estable por varias semanas.
- Sangre total anticoagulada con EDTA disódico o potásico (1,5 mg/ml), o con heparina (0,15 mg/ml), de menos de 24 horas luego de recolectada.

Procedimiento

Tomar 10 μ l de sangre y mezclarla con 3 ml de la solución tampón de bis-tris, agitando bien por inversión para homogenizar. Dejar la mezcla 30-45 minutos a temperatura ambiente (20-25 °C). Al término del período de incubación, centrifugar los tubos por cinco minutos y proceder de la siguiente manera:

- Análisis de escrutinio o semicuantitativo:** comparar visualmente el sobrenadante del tubo centrifugado (con cuidado de no resuspender el botón eritrocítico), con una solución de referencia del 25% de hemólisis. Esta referencia se prepara mezclando 10 μ l de la muestra de sangre en es-

tudio, con 12 ml de la solución lisante de Tritón. Si se observa que hay más hemólisis (color rosada) en el patrón de 25% que en la muestra, se descarta la posible esferocitosis. Si la hemólisis de la muestra es mayor o muy semejante al patrón de referencia de 25%, es necesario efectuar la cuantificación de forma cuantitativa (*ver siguiente punto*).

- Análisis cuantitativo:** leer la absorbancia (A) del sobrenadante de la muestra anterior a 540 nm contra blanco de reactivos, teniendo la precaución de no resuspender el botón eritrocítico. Esta A corresponde a la muestra en estudio (Am). Acto seguido, devolver cuantitativamente el sobrenadante leído al tubo original (que contiene el botón) y resuspender bien. Añadir dos gotas de la solución lisante de Tritón y agitar bien por inversión repetida, para asegurarse que la hemólisis sea total. Leer la A, la cual corresponderá al 100% de hemólisis (Ap 100). El resultado expresa el porcentaje de hemólisis de la muestra, calculado mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ hemólisis} = \frac{Am}{Ap} \times 100$$

Valores de referencia reportados por los autores: 0-30% ($12,5 \pm 8$) en sujetos sin esferocitosis, y más de 28,5% ($60,8 \pm 16,5$) en casos de esferocitosis.

Comentarios

- La glicerólisis puede dar falsos positivos en pacientes con enfermedad renal crónica (en diálisis) y en mujeres en el último trimestre de embarazo.
- Usualmente da positiva en anemia hemolítica autoinmune que cursa con esferocitos y en anemia mecánica severa.
- La sensibilidad de la prueba de Vettore aumenta considerablemente al incubar la sangre a temperatura ambiente por 24 horas.
- Estudios realizados en Costa Rica mostraron que la prueba más sensible y específica para la detección de EH es la prueba rosada de glicerólisis (Vettore).
- Ante muestras sospechosas por EH, se recomienda realizar en forma conjunta las pruebas de Vettore y la curva de FO al fresco. En caso de duda se debe recurrir a las pruebas con sangre incubada por 24 horas (para glicerólisis rosada a temperatura ambiente) y a 37 °C, para la curva estándar de FO post-incubación.

PRUEBA DE LA AUTOHEMÓLISIS (TÉCNICA SIMPLIFICADA)

Cuando la sangre normal (desfibrinada o tomada estérilmente con EDTA) se incuba a 37 °C por 24 horas, solo ocurre una ligera hemólisis. Esta prueba es inespecífica, pero de gran valor para el diagnóstico de esferocitosis, así como para demostrar hemólisis intracorporal (por ejemplo, eritroenzimopatías).

Reactivo

Solución estéril de glucosa al 5% en agua destilada.

Método

- a. Se obtiene sangre desfibrinada o tomada estérilmente con EDTA tripotásico o heparina, del paciente y de un control normal. Evitar la hemólisis.
- b. En tubos estériles y marcados a y b, se procede de la siguiente forma (por duplicado):

- *Tubo a*: 1 ml de sangre.
- *Tubo b*: 1 ml de sangre más 0,1 de solución de glucosa al 5%.

- c. Se separa 1 ml de plasma o suero y se guarda en refrigeración (preincubación). Los tubos a y b se incuban a 37 °C, durante 48 horas.
- d. Al término de la incubación, se invierte de nuevo cada tubo por lo menos 10 veces.
- e. Se determina la Hb (0,02 ml de sangre en 5 ml de reactivo de Van Kampen).
- f. Se centrifuga el resto de la sangre y se separa el sobrenadante. Se coloca 0,1 ml de plasma o suero en 2,5 ml de Van Kampen y se procede como en el punto e. Lo mismo se hace con el suero o plasma de preincubación. La absorbancia se lee a 540 nm.

Cálculo

$$\% \text{ hemólisis} = \frac{\text{D.O. del suero o plasma post-incubación} - \text{D.O. del suero preincubación}}{\text{D.O. de la sangre total} \times 10} \times 100$$

Interpretación (Cuadro N° 1)

- a. La hemólisis espontánea que sufre una sangre normal estéril sin glucosa después de 48 horas de incubación a 37 °C, es muy poca (menos de 3,5%). Asimismo, la adición de glucosa y ATP reducen el grado de hemólisis, el cual varía según las condiciones en que se hace la prueba.
- b. Un aumento en la autohemólisis se puede deber a múltiples causas patológicas, hereditarias o adquiridas, que afectan los glóbulos rojos. Aunque el fenómeno es inespecífico, la hemólisis acelerada debe considerarse como un proceso hemolítico, tal vez intracorporal.

- c. En varios tipos de anemias hemolíticas se observa autohemólisis aumentada. Estas anemias se pueden incluir dentro de tres patrones:

- El *tipo I* de Dacie, en el cual la autohemólisis es normal o ligeramente aumentada (3-6%); este grado de autohemólisis se corrige con glucosa y ATP.
- El *tipo II* de Dacie, donde la autohemólisis se aumenta claramente (7-15%) y no se corrige con glucosa, pero sí con la adición de ATP.
- El *tipo III* se observa en pacientes con EH y en la hemoglobinuria paroxística nocturna; en este caso la autohemólisis está francamente aumentada (hasta 30%) y se corrige con glucosa y ATP (Cuadro N° 1).

Cuadro N° 1. Patrones de autohemólisis en muestras de sangre incubadas a 37 °C durante 48 horas			
Condición	Adición		
	Ninguna	Glucosa	ATP (pH 6.8)
Normal	1,0 (Menos de 2,0)	0,4 (0 - 0,9)	0,2 (0,1 - 0,8)
Tipo I (Deficiencia G-6-PD)	3,0 (1 - 6)	1,3 (0,5 - 4,0)	1,0 (1,4 - 2,0)
Tipo II (Deficiencia PK)	13 (8 - 44)	15 (4 - 48)	1,0 (0,2 - 2,0)
Tipo III (EH)	16 (6 - 30)	3,0 (0,2 - 14)	3,0 (1 - 6)
Anemia hemolítica autoinmune (con esferocitos)		Variable	
Déficit de hexoquinasa, glucosa fosfato isomerasa, triosafosfato isomerasa y fosfaglicerokinasa		Normal	Normal (Tipo III)
Hbs inestables		Normal	Normal (Tipo III)

- d. Autohemólisis del tipo I del patrón se observa en la deficiencia de hexoquinasa, como en la anemia hemolítica congénita no esferocítica.
- e. Autohemólisis del tipo II se observa en pacientes con deficiencia de piruvato quinasa (otro ejemplo de anemia hemolítica congénita no esferocítica) y en pacientes con anemia hemolítica esferocítica autoinmune.
- f. El tipo III se observa en pacientes con EH y en aquellos con deficiencia de varias enzimas.
- g. Ocasionalmente se presentan excepciones a lo señalado en los puntos anteriores.
- h. Los glicósidos cardíacos aumentan la autohemólisis, mientras que la sacarosa, el ATP (ambas moléculas osmóticamente activas) y la inosina la inhiben. Estas tres últimas sustancias ayudan a confirmar un perfil de autohemólisis para el diagnóstico de EH, así como de ciertas eritroenzimopatías.

En general, la prueba de la autohemólisis -que no es más que una extensión de la FO- es muy sensitiva y usualmente muy útil, a pesar de que los resultados son

variables de laboratorio y en algunos casos se encuentran falsos positivos.

BIBLIOGRAFÍA

- Bucx MJ, Breed WP, Hoffmann JJ. Comparison of acidified glycerol lysis test, pink test and osmotic fragility test in hereditary spherocytosis: effect of incubation. *Eur J Haematol* 1988; 40(3): 227-231.
- Gimferrer E, Baiget M, Rutilant ML. Experiencia con la prueba de lisis eritrocitaria al glicerol. *Sangre* 1978; 23(5): 572.
- Kattamis C, Efremor G, Pootrakul S. Effectiveness of one tube osmotic fragility screening in detecting beta thalassemia trait. *J Med Genet* 1981; 18(4): 266-270.
- King MJ, Zanella A. Hereditary red cell membrane disorders and laboratory diagnostic testing. *Int J Lab Hematol* 2013; 35(3): 237-243.
- Rodríguez WE, Sáenz GF, Orlich J. Diagnóstico de la esferocitosis hereditaria con pruebas de glicerólisis. *Rev Costarric Cienc Méd* 1989; 10(2): 57-72.
- Roper D, Layton M. Investigation of the hereditary haemolytic anaemias: membrane and enzyme abnormalities. En: Lewis SM, Bain BJ, Bates I. *Dacie and Lewis: practical haematology*.

10 ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2006. p. 206-2015.

Sáenz GF, Moreira J. Laboratorio de hemoglobinopatías: Manual Latinoamericano. Costa Rica: Ministerio de Salud; 1980.

Vettore L, Zanella A, Molaro G, de Metteis MC, Pavesi M, Mariani M. A new test for the laboratory diagnosis of spherocytosis. *Acta haemat* 1984; 72(4): 258-263.

ESTUDIO DE LA HEMOGLOBINA POR ELECTROFORESIS Y POR CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN

Dr. German F. Sáenz Renauld
Dr. Walter E. Rodríguez Romero

ELECTROFORESIS DE LA HEMOGLOBINA

Las variantes anormales de hemoglobina (Hb) que se han descrito, tienen entre sí distinta composición de aminoácidos; en la mayoría de los casos, la única diferencia con respecto a la HbA es un único aminoácido en una de las cadenas de polipéptidos (como resultado del cambio de una base de un triplete codificador). Como estas diferencias estructurales se reflejan frecuentemente en el comportamiento electroforético de las Hbs, la electroforesis es uno de los métodos más importantes para su estudio. Sin embargo, en ocasiones las anomalías son demasiado sutiles, por lo que además de la electroforesis se requieren de otros métodos analíticos para su correcta identificación. Este es el caso de las denominadas "Hbs silenciosas" (grupo al cual pertenecen la mayoría de las Hbs inestables), en donde las mutaciones no tienen alteraciones de las cargas eléctricas y suelen presentar una normalidad electroforética semejante a la HbA.

El fraccionamiento electroforético de la Hb fue descrito por primera vez en 1949 por Pauling *et al*, cuando descubrieron una Hb anormal asociada con el fenómeno de drepanocitosis (HbS); así se formuló el concepto de enfermedad molecular. De tal forma, la primera aplicación clínica de la electroforesis de Hb fue para la diferenciación de algunas anemias hemolíticas.

Mediante la electroforesis se identifican las Hbs normales y una gran mayoría de las variantes, en las cuales la alteración de cargas eléctricas es producto de la sustitución de aminoácidos en sus cadenas de globina, con diferentes puntos isoelectrónicos.

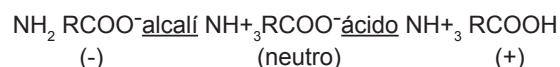
Como las moléculas proteicas pueden variar en forma, volumen y carga electrostática, se emplea el método electroforético para separarlas y clasificarlas. En la mayor parte de los laboratorios clínicos, la electroforesis se realiza empleando gel de almidón, acetato de celulosa y gel de agar como medios de sostén, y un campo eléctrico proporcionado por una fuente de voltaje constante.

Cabe mencionar que todas las proteínas tienen grupos amino y carboxilo libres, los cuales aparecen a lo largo

de las cadenas polipeptídicas. Los carboxilo de los ácidos glutámico y aspártico y los amino de la lisina y arginina, son los grupos cargados eléctricamente de las proteínas, y su carga depende del pH del medio en que se encuentre la proteína.

El número de tales aminoácidos en la superficie de la proteína, determinará su carga electrostática final. El pH al que una proteína muestra carga cero, se conoce como punto isoelectrónico. En ese pH la proteína no migrará cuando se coloca en un campo eléctrico. A pH ácido, respecto de su punto isoelectrónico, la proteína llevará carga (+), y a pH alcalino su carga será (-). Así, por ejemplo, entre pHs de 8.0 y 9.0, la Hb se cargará negativamente, migrando en dirección al polo positivo (ácido).

Lo antes indicado se explica mediante el siguiente esquema, donde se demuestra la influencia del cambio de pH en la carga llevada por los aminoácidos:



En cada cadena peptídica existirá solo un grupo NH_3^+ terminal y un grupo COO^- , pero podrían existir cargas adicionales de algunos aminoácidos que se encuentren en el lado "R" de la cadena. Esas cadenas laterales son importantes, puesto que determinan la carga de una molécula de proteína (una proteína en forma simple puede considerarse como un aminoácido). Sin embargo, el punto isoelectrónico de una proteína es el pH, donde el total de cargas negativas presentes es igual a las cargas positivas de esta. Por ejemplo, el punto isoelectrónico de la HbA es pH 6.8.

La carga de la superficie de una proteína es el resultado de numerosas cadenas laterales de residuos de aminoácidos como glutamilo y aspartilo, que llevan carga negativa (COO^-), y de arginilo y lisilo que tienen carga positiva (NH_3^+).

En la Hb, como en todas las moléculas de proteínas globulares, la carga dependerá no tanto del número

total de esas cadenas colaterales, sino del total de aminoácidos cargados que se encuentran en la superficie de la molécula y que están en contacto con el medio exterior.

Si se aplica la fuerza de un campo eléctrico externo a moléculas de proteínas colocadas en un medio de sostén convencional -y se utiliza un tampón adecuado-, estas se ponen en movimiento. De tal forma, en soluciones ácidas, la proteína se dirige al cátodo (por tener cargas (+)); en soluciones alcalinas al ánodo (por tener carga (-)); y a ciertos valores de pH no migra a ningún polo, por tener carga cero, es decir, por estar en su punto isoeléctrico.

Cada proteína tiene una movilidad característica que depende de la carga neta; por lo tanto, cuando una solución de varias proteínas se somete a un campo eléctrico, estas se separarán gradualmente, y cuanto mayor sea la diferencia de movilidad entre las moléculas, más completa será la separación que se puede obtener.

Variedades de Hb

La Hb falciforme (S) y la normal (A) solo difieren en un aminoácido; específicamente, la cadena peptídica β de la molécula de HbS posee valina en una zona donde la HbA contiene ácido glutámico (posición 6 de la cadena β). La sustitución de valina por el ácido glutámico con la consiguiente pérdida de un grupo carboxilo, por cadena β , explica las diferencias electroforéticas de las dos hemoglobinas.

En el caso de la HbC, el ácido glutámico que se encuentra en la posición 6 de las cadenas β de la HbA, es sustituido por la lisina, lo que genera pérdida de carga negativa y ganancia de una carga positiva por cadena β . Esa es la causa por la que la HbC es lenta y migra muy cerca del origen (lado catódico) en acetato y almidón a pH alcalino.

Aunque se han identificado muchos tipos de Hbs, hay cinco que son de particular importancia clínica: la A, la C, la S, la F y la A_2 , colocadas en orden de aumento de movilidad anódica electroforética, cuando se usa tampón de pH 8.6 y acetato de celulosa, gel de agar, agarosa o almidón como medios de sostén.

A pH 8.6, las Hbs A_2 y C migran en la misma posición. Se diferencian porque la HbC en el estado heterocigoto constituye un 25-40% del total de la Hb, mientras que la Hb A_2 se encuentra en un porcentaje inferior al 10%, aun en los casos de talasemia A_2 , en los cuales esta fracción se encuentra aumentada al doble o casi al doble de lo normal.

La HbS, por su parte, migra en la misma posición de las HbD, G Philadelphia y Korle Bu. La diferenciación puede hacerse por varios otros métodos, como por ejemplo, la electroforesis en gel de agar a pH 6.1. En estas condiciones la HbD, la G y la Korle Bu migran igual que la A, no así la HbS, que se desplaza al polo positivo.

ELECTROFORESIS EN ACETATO DE CELULOSA

Las ventajas del uso del acetato de celulosa son las siguientes: la absorción de las proteínas analizadas se procesa de manera homogénea gracias a su microporosidad y a una composición química relativamente pura; el fraccionamiento es rápido; se aplican o requieren pequeñas cantidades de muestra sin que se pierda sensibilidad analítica; y permite la "transparentización" de las cintas para una mejor lectura y archivo.

Fuerza iónica

Se usa una fuerza iónica de 0,1 a 0,01 para la separación de proteínas (0,05 es buena). Cuanto más baja sea la fuerza iónica, mayor es la migración de las proteínas.

Voltaje

A mayor voltaje, las proteínas se mueven con mayor rapidez, pero aumenta el calor, y con este las proteínas se desnaturalizan fácilmente; por tanto, el calor no debe exceder de 50 °C. Altas temperaturas también conducen a la evaporación y a un incremento en la fuerza iónica del tampón.

Tiempo

Cuanto mayor sea el tiempo de migración, mayor la oportunidad de que aparezcan artefactos.

Medios

Existen diferentes tipos de acetato de celulosa. En general, la estructura de cada acetato se asemeja a la de una esponja, con una matriz de poros relativamente uniformes, distribuidos al azar. El tamaño del poro, su distribución y el volumen, varían con la longitud y el grado de acetilación de la cadena de celulosa (0% a 44%).

Diferentes casas comerciales pueden diferir de lo que aquí se describe. Por lo tanto, es necesario seguir las recomendaciones e instrucciones que señale cada casa comercial.

Las figuras N° 1, N° 2, N° 3 y N° 4, muestran los patrones de migración que se pueden esperar cuando se utiliza esta técnica.

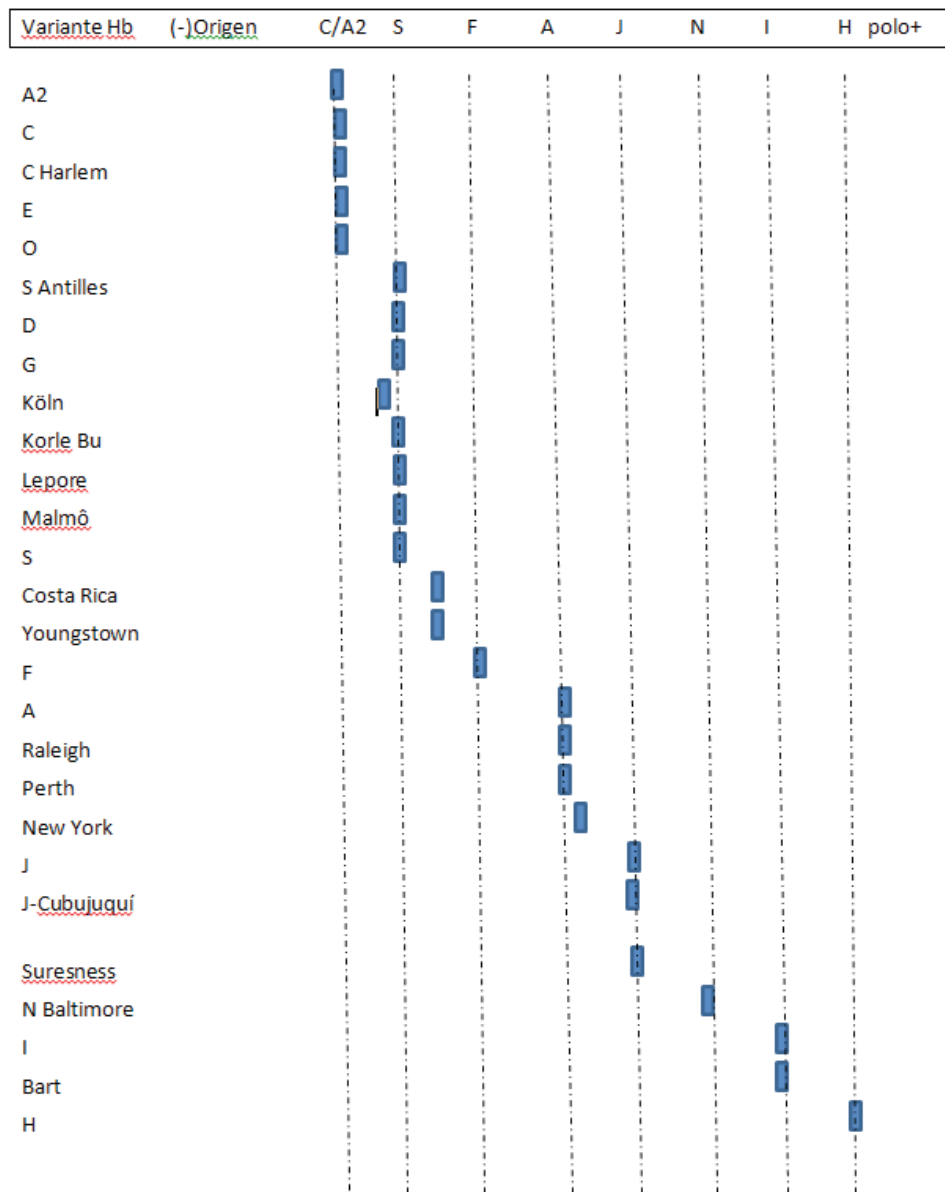


Figura N° 1. Movilidades relativas de algunas Hbs en acetato de celulosa (TEB pH 8.4).
Se incluyen las principales variantes descritas en Costa Rica.

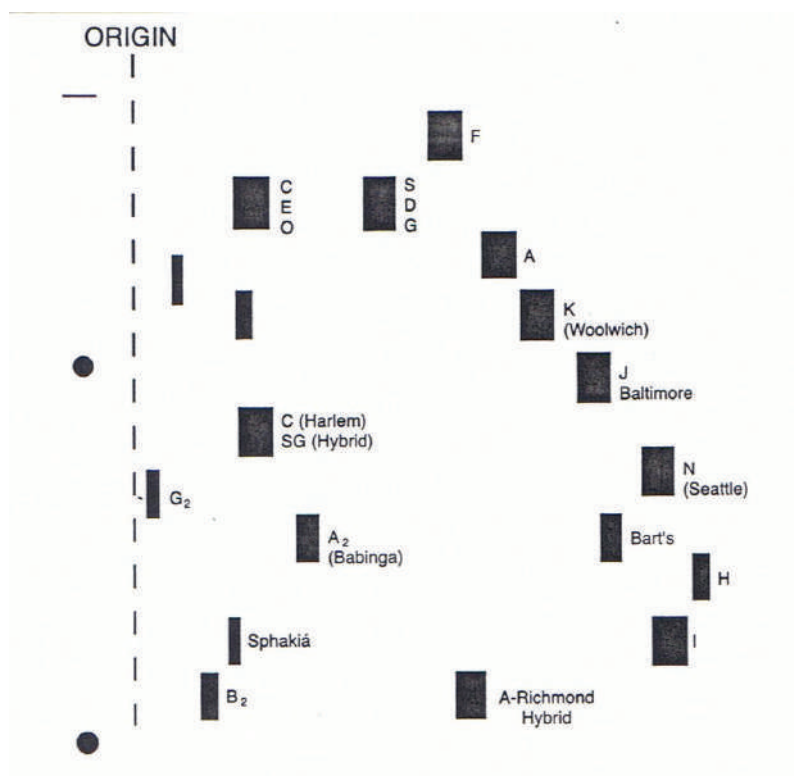


Figura N° 2. Migraciones electroforéticas relativas de algunas variantes a pH alcalino (acetato/almidón).

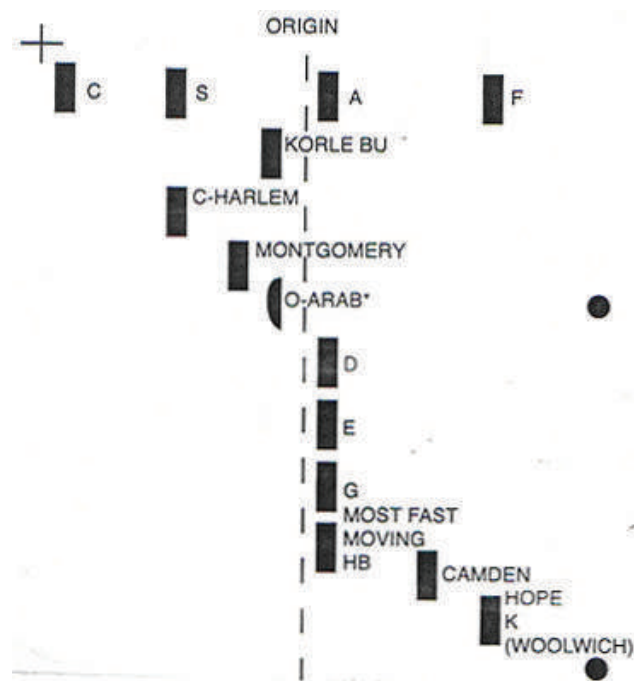


Figura N° 3. Movilidades relativas de algunas Hbs en agar citrado (pH 6.0-6.2).

Variante	+	C	S	A	F	-
C $\beta^{6\text{-glu-lis}}$		■				
C Zinguinchor						
$\beta^{6\text{glu-val}, 58 \text{ pro-arg}}$				■		
C Harlem $\beta^{glu-val, 73 \text{ asp-asn}}$			■			
D Los Ángeles $\beta^{121\text{-glu-gln}}$				■		
E $\beta^{26\text{-glu-lis}}$				■		
F $\alpha_2\gamma_2$					■	
G Philadelphia $\alpha^{68 \text{ Asn-Lis}}$				■		
G San José $\beta^{7\text{-glu-gli}}$		■				
I $\alpha^{16\text{-lis-glu}}$				■		
J Baltimore $\beta^{16\text{-gli-asp}}$				■		
J Cubujuquí $\alpha^{141 \text{ arg-ser}}$				■		
K Woolwich $\beta^{132 \text{ lis-gln}}$					■	
Korle - Bu $\beta^{73 \text{ asp-asn}}$				■		
Lepore (Baltimore) (Fusión: 850 - β 86)				■		
M Saskatoon β 63 His ® Tir				■		
N Baltimore $\beta^{95 \text{ lis-glu}}$				■		
O Arabia $\beta^{121\text{-glu-lis}}$			■			
S Travis $\beta^{6\text{-glu-val}, \beta^{142 \text{ ala-val}}}$		■				
S Antilles $\beta^{6\text{-glu-val}, \beta^{23 \text{ val-Ile}}}$			■			
Suresnes $\alpha^{14 \text{ larg-his}}$				■		
H (β^4)				■		
Bart (γ^4)						■
Costa Rica $\beta^{77 \text{ His-Arg}}$				■		

Figura N° 4. Electroforesis en gel de agar citrato.

Reactivos*Tampón T.E.B. pH 8.4 – 8.6*

Tris (hidroximetil) amino-metano	10,2 g
EDTA (ácido, sal disódica)	0,6 g
H ₃ BO ₃	3,2 g
Agua destilada c.s.p.	1.000 ml

Colorante Ponceau S

Ponceau S	0,5 g
Ácido tricloroacético al 5% c.s.p.	100 ml

Procedimiento

A continuación se indica el procedimiento general para la electroforesis en acetato de celulosa cuando se utiliza equipo de la casa Helena (Texas).

- a. Se coloca el tampón en la cámara Helena: se sumergen en este los puentes de esponja o de papel de filtro y se ponen en la posición respectiva. Para lograr que el tampón se mantenga frío (2-8 °C), la cámara o cuba se coloca encima de un par de tarros o bolsas de hielo mágico.
- b. Se sumergen en el tampón las placas de acetato de celulosa (Titán III, 2 3/8" x 3", Helena) un mínimo de 20 minutos antes de su uso.
- c. Las cintas o placas de acetato de celulosa se secan entre dos piezas de papel absorbente, en forma rápida y uniforme para remover el exceso de tampón.
- d. Se aplican las muestras a una distancia aproximada de 3 mm del catodo.
- e. Si se usan cintas Titán III, se coloca la placa invertida en la cámara, y con la ayuda de un portaobjetos que se pone sobre la primera, se asegura un buen contacto.
- f. Se aplica una corriente de 450 voltios por 20 minutos a temperatura fría (10 °C).
- g. Las placas o cintas se remueven de la cámara y se tiñen por un mínimo de tres minutos con Ponceau-S fresco.
- h. Se remueve el exceso de colorante con ácido acético al 5%, mediante tres lavados de dos minutos cada uno. Si se desea, se pueden seguirse los siguientes puntos (i-l), para transparentizar la cinta.
- i. Se fija la placa con metanol absoluto durante 3-5 minutos.
- j. Se aclaran las cintas con una mezcla de ácido acético glacial al 20% en metanol absoluto, por 10 minutos.
- k. Se seca a 65 °C durante 10 minutos (comparar el patrón obtenido de acuerdo con las figuras N° 1 y N° 2).
- l. La placa aclarada y debidamente identificada se introduce en un sobre plástico. Este paso permite guardar por tiempo indefinido los patrones electroforéticos.

Nota: es muy importante que la concentración de Hb del hemolizado de prueba se encuentre en niveles de 3 a 6 g/dl, así como que el sistema de aplicación de la muestra, sea cual sea el aplicador que se use, se estandarice adecuadamente.

Cuantificación

Después de fraccionadas las proteínas por electroforesis, estas se pueden cuantificar mediante diversos

métodos; el más popular consiste en teñir la proteína con un colorante visible, y luego medir la intensidad del colorante y correlacionarlo con la concentración de la proteína. El colorante Ponceau-S es el que generalmente se utiliza, y las fracciones se eluyen y miden en un espectrofotómetro, o se aclaran las cintas y se leen en un densitómetro. En la actualidad, la lectura espectrofotométrica de los eluidos oxihemoglobínicos de las fracciones electroforéticas, se considera el método más exacto y reproducible; se recomienda eliminar de la práctica diaria la cuantificación densitométrica o la lectura de los eluidos de fracciones previamente teñidas con cualquier colorante.

Recomendaciones para evitar errores en la electroforesis, en especial con el uso de cintas de acetato de celulosa

- a. Las manos deben estar limpias cuando se manipulan las cintas de acetato. Estas solo se tocan en los bordes o se usan pinzas para ese fin.
- b. Se determina el voltaje, el tiempo de corrida y la fuerza iónica del tampón para el sistema que se utiliza en cada laboratorio.
- c. Se controla el pH del tampón recién preparado cuando se rehúse y cuando la separación no sea adecuada. El tampón debe estar siempre bajo refrigeración y debe descartarse cuando se vea turbio o contaminado con hongos.
- d. Se debe estar seguro de que las cintas o placas estén equilibradas en el tampón por un mínimo de 20 minutos antes de aplicar las muestras. Las cintas se sumergen lentamente en el tampón para evitar que queden secuestradas burbujas de aire en los poros, ya que estas pueden distorsionar el movimiento de la proteína y arruinar la prueba. Se deben seguir las instrucciones de cada casa comercial (Helena, Gelman, etc.).
- e. Se seca bien la cinta antes de su uso, para que entre rápidamente en la matriz porosa y no se esparza. Debe evitarse un secado excesivo de la cinta, para que no se reabsorba mucho tampón de la cuba cuando aquella se coloca en la cámara. De lo contrario, esto causaría un indeseable y excesivo movimiento del tampón en la cinta.
- f. Después de secar la cinta, se aplica la muestra tan rápido como sea posible y se coloca de inmediato en la cámara. El movimiento del tampón comienza enseguida; por eso la corriente debe aplicarse rápidamente, para evitar la difusión espontánea.
- g. Se debe tener seguridad de que la aplicación de la muestra no sea muy amplia o gruesa, pues de lo contrario se obtendría una resolución pobre.
- h. Se lava con agua destilada y se seca bien el aplicador entre cada aplicación de las muestras.
- i. Las cintas deben estar bien aclaradas después de teñidas, especialmente si van a ser leídas en un

densitómetro. Esto elimina reflexión de la luz por el acetato de celulosa. La estructura del acetato de celulosa se desdobra (disuelve) gradualmente por el agente aclarante.

- j. Como se señaló, los procedimientos con acetato de celulosa varían de acuerdo con el tipo de acetato y las instrucciones del fabricante. En ocasiones se le aplica a las cintas o placas una densa cantidad de hemolizado con posterior tinción de bencidina tras la electroforesis. Este procedimiento es el que se utiliza para la detección de HbH a pH neutro. Asimismo, cuando una variante hemoglobínica de cadenas α ($\alpha_2^x \beta_2^A$) se encuentra bajo estudio, la fracción anormal $\alpha_2^x \beta_2^A$ (también llamada extra A_2) aparece como una muy pequeña banda azul detrás de la banda rojiza de la anhídrida carbónica. Algunas veces, las cintas de acetato se tiñen primero con cualquier colorante para proteínas y luego se contratiñen con un reactivo de bencidina o de O dianisidina.

Todo escrutinio electroforético debe iniciarse a pH alcalino (8.4-9.1), pues es el sistema que mejor permite la identificación preliminar de Hbs rápidas y lentas. Esta investigación se lleva a cabo con rapidez y sensibilidad con el uso de cintas o placas de acetato de celulosa. De ahí que con detalle preconicemos el método. Sin embargo, no queremos dejar de insistir en la bondad y el bajo costo de los métodos que utilizan almidón para esta fase inicial en la identificación de Hbs anormales.

De igual forma, debe mencionarse que la electroforesis de Hb tiene sus limitaciones; quizás la más importante sea su incapacidad para detectar mutaciones entre aminoácidos neutros, que ocurren en la mayoría de las sustituciones.

Por otra parte, cabe indicar que de las aproximadamente 700 variantes de Hb conocidas, solo tres representan al menos el 90% de las hemoglobinopatías que son detectadas en los laboratorios del mundo; estas son las Hbs S, C y E. Ampliando este comentario, se puede decir que las Hbs anormales más frecuentes por orden de prevalencia son: S, E, C, D-Punjab (D-Los Angeles), G-Philadelphia, O-Arab, HbH, Korle-Bu y Lepore.

ELECTROFORESIS DE LA HB EN GEL DE AGAR-CITRATO DE CAPA FINA (pH 6.0-6.2)

La electroforesis en geles de agar-citrato pH 6.0-6.2, implica el movimiento de las Hbs (con una carga neta positiva) en un campo eléctrico definido y en un gel de agar al 1% como medio de soporte. La separación de las variantes Hbs anormales y normales con este procedimiento, se basa no solo en la carga electroforética de las proteínas, sino también en la absorción de las Hbs al agar (o a sus impurezas). Esta absorción puede

relacionarse con la solubilidad de la Hb. Por lo tanto, la migración de una Hb dada en los geles de agar difiere de otros medios, en los cuales la migración se basa fundamentalmente en su carga electroforética.

La electroforesis en gel de agar ácido (pH 6.2) es específica para diferenciar algunos tipos de hemoglobinas más lentas que la HbA (Figura N° 3). Además, permite separar la HbS de la G, D y Korle Bu, ya que estas permanecen junto a la A, y la S se desplaza al polo positivo. De igual forma, logra diferenciar la HbC de la HbE y la HbO.

Tampón trabajo de citrato 0,05 M

Se disuelven 14,7 g de citrato de sodio ($C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$) en aproximadamente 800 ml de agua destilada-desionizada, en un frasco volumétrico de 1.000 ml. Se ajusta el pH 6.1 con ácido cítrico 30% y se lleva a un litro. Esta solución es estable en refrigeración por un mínimo de seis semanas.

Agar al 1%

Se agrega 1 g de agar Difco purificado a 100 ml del tampón de trabajo. En un mechero Bunsen se calienta hasta que se disuelva todo el agar (por lo general requiere una ebullición suave de 2-3 minutos). Se enfría ligeramente. Se agrega una gota de una solución de KCN al 5%. Se usan portaobjetos que de previo hayan sido precubiertos con agar al 0,1% en agua destilada y se deja secar. También, se puede usar el soporte plástico que se utiliza en las cintas de acetato. Sobre cada uno de los portaobjetos, que deben estar en una superficie nivelada, se vierten 1,5-2,0 ml de la solución de agar caliente. Se usa una pipeta serológica de 5 ml para dicha operación. Se trabaja rápidamente y con la seguridad de que el agar quede distribuido de manera uniforme en el portaobjetos.

Preparación del hemolizado

Se pone una gota de hemolizado al 10-12 g/dl en un tubo de ensayo y se le agregan de 3-5 gotas de tampón de trabajo pH 6.0-6.2, para obtener una concentración de Hb de 1-3 g/dl, de preferencia de 1g/dl.

Solución de bencidina

- a. Solución madre:

Bencidina	1 g
Nitroprusiato de sodio	1 g
Ácido acético glacial	25 ml
Agua destilada c.s.p.	1 litro

- b. Para trabajar (al momento de uso): se toman 5 ml de la solución anterior y se añaden 0,05 ml de H_2O_2 al 30%.

Procedimiento

- Después de que el agar se ha enfriado, se aplica el hemolizado diluido de cada muestra, insertando primero el extremo enderezado de un "clip" en la solución de Hb, y sembrando luego en el agar a una distancia de 1 cm del ánodo. Se debe asegurar que el "clip" quede insertado hasta el fondo del agar. De otra forma, se utiliza un aplicador múltiple con dientes de plástico y se siembra el hemolizado sobre el agar con una ligera presión, la necesaria para que se impregne el agar de hemolizado, por unos cinco segundos. Si se utiliza este sistema, se deben chorrear 4 ml del agar licuado y caliente sobre un portaobjetos de 6 x 7 cm. En esta circunstancia pueden sembrarse hasta seis muestras diferentes.
- Se aplica un control y un desconocido (solo dos muestras en cada portaobjetos). Cada desconocido se monta por duplicado (dos portaobjetos para cada incógnita).
- Los portaobjetos se colocan invertidos en una cámara Helena que contenga la solución de trabajo fría (50 ml en cada cubo). Se controla que las muestras queden del lado del ánodo y el agar bien sentado sobre las tiras de papel de filtro (cuando se trate de una base plástica en la cual se chorreó el agar, por ejemplo la base plástica de las cintas usadas de Titán III) o sobre las esponjas absorbentes (cuando el agar se ha chorreado sobre vidrio como portaobjetos convencional o uno de 6 x 7 cm). Previamente se debe haber puesto la cámara sobre recipientes que contengan hielo mágico.
- La electroforesis se corre aplicando una corriente de 50-90 voltios (alrededor de 8 mA/placa) durante una hora. En la cámara Helena se pueden colocar un máximo de ocho portaobjetos o dos placas de 6 x 7 cm. Las placas deben colocarse rápidamente en la cámara después de aplicar las muestras, para evitar desecación o difusión de estas.
- Luego de una hora, se quita la corriente y se sacan las láminas de la cámara. Se les agrega la solución de bencidina hasta que comience a aparecer un color azul; inmediatamente se lava con agua del tubo y se coloca la placa en un recipiente con agua destilada para lavar por completo el exceso de bencidina. Inmediatamente se leen los resultados, ya que luego pueden aparecer manchas difusas artefactuales. Las placas se ponen en una toalla para absorber el exceso de humedad. Después se colocan las preparaciones en una estufa a $37 \pm 3^\circ C$ y se dejan secar (una o dos horas).

Notas y precauciones

- Para este método se aplican las mismas precauciones que se señalan para cualquier procedimiento electroforético (ver electroforesis en acetato de celulosa).
- Se insiste en que para obtener mejores resultados debe darse a los portaobjetos un revestimiento preliminar de agar caliente (0,1% en agua desionizada), a fin de que el agar citrato se adhiera mejor. Por otra parte, esta operación previa permite escribir sobre la tenue capa de agar el orden de las muestras y su respectiva identificación.
- La solución tampón madre puede guardarse hasta por seis semanas a $4^\circ C$. La solución de trabajo debe usarse bien fría, así como la cámara electroforética, para obtener óptimas resoluciones.
- De acuerdo con el interés de cada laboratorio, se pueden preparar láminas de vidrio de diferente tamaño para acomodar más muestras (ejemplo: 2 x 3 pulgadas para siete muestras y unos 4 ml de agar).
- La bencidina base, el dihidrocloruro de bencidina y la O-toluidina tienen propiedades carcinogénicas. Se ha recomendado la siguiente bencidina que no presenta dicho problema: 3,3', 5,5' - tetrametil - bencidina (0,1 g en 25 ml de ácido acético glacial y luego de disuelta, llevar a 100 ml con agua destilada).
- El aplicador de la casa Helena (ocho muestras) es muy práctico para estudios individuales. Si se usan aplicadores convencionales, se debe tener cuidado de no romper el agar. Las muestras se aplican una y otra vez -sin mover el aplicador- y deben sembrarse en la propia superficie del gel.
- El método que aquí se preconiza y que ha sido adaptado del que se usa en el CDC (Atlanta, Georgia), se debe considerar como un método de escrutinio en el gel de capa fina.
- Se ha visto que la sensibilidad de este método para HbS, a pH 6.1 es tan baja como de 0,8 g/L. Asimismo, la electroforesis en gel de capa fina realizada con portaobjetos (75 x 25 mm) puede ser completa en 10 - 15 minutos a 220 V, siempre y cuando la concentración del hemolizado se mantenga baja (1,0-2,0 g/dl).

ASPECTOS INTERPRETATIVOS DE LOS PATRONES ELECTROFORÉTICOS DE LA HB EN ACETATO DE CELULOSA Y EN GEL DE AGAR

Las variantes de la HbA, por motivos de conveniencia, se han clasificado en tres grupos (lentas, rápidas y similares a HbA), de acuerdo con su movilidad electroforética en acetato de celulosa, pH 8.4-8.8.

Variantes lentas

Son las más catódicas o menos anódicas, como la HbC ($\beta^{6\text{-glu-lis}}$), la cual prevalece sobre todo en raza negra y negroide. La movilidad de la HbC en acetato de celulosa es similar o idéntica a la de la HbA₂, pequeña fracción adulta normal. Sin embargo, no es posible confundirlas, debido a que la HbA₂ normalmente está presente en una concentración aproximada de 3% de la Hb total y rara vez se encuentra en concentraciones mayores a 8%.

La HbC en la condición heterocigota constituye aproximadamente de 30-40% de la Hb total. La HbE ($\beta^{26\text{-glu-lis}}$) y la HbO ($\beta^{121\text{-glu-lis}}$), por su parte, son variantes menos comunes, cuya migración electroforética a pH 8.4 es similar a la de la HbC. El cambio del aminoácido glu-lis es el único que puede producir esta movilidad característica, por mutación única. Las variantes que presentan sustituciones de glu-lis en otras localizaciones de la molécula, también presentan movilidad electroforética semejante a la de la HbC a pH alcalino.

Otras variantes que se mueven como la HbC sin presentar la sustitución glu-lis, es la HbC Harlem y la C Zinguinchor, que aunque son variantes raras, ilustran la necesidad de la diferenciación que debe hacerse siempre que se está en presencia de un patrón electroforético tipo Hb"AC". En la HbC Harlem hay dos mutaciones: la sustitución $\beta^{26\text{-glu-lis}}$ de la HbS, que confiere a la HbC Harlem algunas de las propiedades de esta Hb, y la sustitución $\beta^{73\text{-asp-asn}}$, la cual le da una carga positiva adicional, de modo que en electroforesis a pH alcalino, la HbC Harlem migra como la HbC. La C Zinguinchor es $\beta^{6\text{-glu-val}}$; 58 pro-arg.

Las variantes lentas semejantes a HbS ($\beta^{6\text{-glu-val}}$) se mueven en electroforesis a pH alcalino aproximadamente a la mitad de la distancia entre la HbA y la HbC. La HbS, por supuesto, es la más común de todas las Hbs anormales en el mundo y no es privativa de raza negra. Aparece con más frecuencia en el estado heterocigótico (AS). Otras variantes con movilidad similar son la HbD, la Hb G y la Korle Bu.

La Hb Costa Rica ($\alpha_2\beta_2^{77\text{ His-Arg}}$) presenta una movilidad intermedia entre la HbS y la HbF en acetato de celulosa; en el gel de agar ácido permanece en el punto de aplicación. Esta variante es importante, ya que es la primera hemoglobinopatía descrita cuyo mecanismo de producción es una mutación somática. La Hb Youngstown tiene una movilidad parecida ($\alpha_2\beta_2^{101\text{ glu-ala}}$).

La HbF ($\alpha_2\delta_2^{136\text{ ala}}\delta_2^{136\text{ gli}}$) que migra en acetato de celulosa entre la HbS y la HbA y que a veces se separa incompletamente de la última, no se ha considerado en una clasificación aparte.

En el adulto normal, la HbF está presente en concentraciones de menos de 2%, cantidad demasiado pequeña para ser demostrable en electroforesis en acetato de celulosa. Sin embargo, el método electroforético de escrutinio para Hbs es suficientemente sensitivo para que cuando se encuentra la HbF en concentraciones del 3% en adelante, pueda ser detectada.

Variantes rápidas

Se trata de variantes hemoglobínicas "más rápidas" (más anódicas) que la HbA en acetato de celulosa. Estas deben diferenciarse de la HbA₃ (ahora correspondiente a la HbA₁), que no es una variante, sino un producto de la HbA normal, que se mueve en forma contigua a esta de manera difusa. Es una fracción que en hemolizadas frescas corresponde a las pequeñas fracciones HbA1^a, A1b, A1c, las cuales se hallan incrementadas hasta un 13% en pacientes diabéticos. Químicamente hablando, son Hbs glicosiladas, en las cuales la glucosa se une de forma preferente con la porción amino terminal de las cadenas β .

La HbK Woolwich ($\beta^{132\text{ Lis-Glutamina}}$) es una variante verdadera, que se separa apenas ligeramente de la HbA. Con una migración semejante, se ha encontrado en Costa Rica la Hb New York ($\beta^{133\text{ val-glu}}$). Aún más rápidas son algunas variedades de la HbJ, seguidas por la HbN (variantes de cadena β), que se mueven anódicamente respecto a la HbA, de manera similar a la migración catódica de la HbC, de forma tal que la HbA es equidistante entre las dos; desde luego que la HbN tiene la sustitución del aminoácido contrario de la HbC, con un residuo de la lisina que se reemplaza por un ácido glutámico (ejemplo: HbN Baltimore ($\beta^{95\text{ lis-glu}}$)). En Costa Rica se han detectado dos Hbs J, la HbJ Cubujuquí ($\delta^{141\text{ arg-ser}}$) y la Hb Suresnes ($\delta^{141\text{ arg-his}}$).

También aquí se encuentran las variantes de cadenas α de "movimiento rápido", como la HbI ($\alpha^{16\text{ lis-glu}}$) hallada en la país en la década de 1990.

Las dos Hbs más rápidas, la Hb Bart (δ^4) (que se encuentra en cordón umbilical) y la HbH (β^4), ambas asociadas con α talasemia en el adulto, son de interés particular, como indicadores de la depresión o supresión genética de las síntesis de cadenas polipeptídicas α . Además, las Hbs son los únicos tetrámeros que carecen completamente de cadenas α .

El método de electroforesis en acetato de celulosa permite una evaluación semicuantitativa de la Hb: la simple condición heterocigótica presenta más HbA que la variante (ejemplo: HbAS), en tanto que en el estado homocigótico hay ausencia total de HbA, al menos en las variantes de cadenas β (como la HbSS). En las mutaciones de cadenas α , puede suceder que a pesar

de la herencia de dos variantes α , se logre demostrar también HbA. Ejemplo de la condición doble heterocigota por HbS J Buda ($\alpha^{74 \text{ asp-an}}$) y G Budapest ($\alpha^{74 \text{ asp-an}}$).

Una diferenciación más difícil se presenta entre la condición de una variante de cadena β con la β talasemia, especialmente debido a que la talasemia puede causar supresión total en las síntesis de HbA. En tal caso, son necesarios los datos clínicos y genéticos para establecer el diagnóstico.

Muchas Hbs con sustituciones de aminoácidos diferentes pueden exhibir movilidad electroforética idéntica; por lo tanto, es importante que el método confirmatorio para la identificación de la Hb, dependa de otra propiedad que no sea la carga electroforética. En el caso de la HbS, su propiedad es la solubilidad. La sustitución en la HbS ($\beta^6 \text{ glu-val}$) le imparte características de insolubilidad, en especial en la forma desoxigenada.

La electroforesis en gel de agar empleando tampón de citrato de pH 6.0 a 6.5, permite detectar la HbF más resistente a la desnaturalización y que se mueve más rápidamente hacia el cátodo. La HbA se mueve detrás de la HbF y se separa bien de esta, mientras que en la mayoría de las Hbs adultas sus cargas electroforéticas se mueven con la HbA. Sin embargo, las Hbs S y C son relativamente insolubles en este medio y se mueven detrás de la HbA, hacia el polo positivo. La electroforesis en agar-citrato sirve para confirmar la identificación de Hbs S y C, así como la de la HbF, separándolas de otras hemoglobinas con movilidades similares a pH 8.4. Este método es indispensable para la identificación de hemoglobinopatías en el recién nacido y extremadamente usado en la diferenciación de enfermedades producidas por HbSS o S-talasemia, cuando el hemolizado de la última contiene una pequeña cantidad de HbA. Este mismo caso se presenta en la rara enfermedad C- β talasemia y su diferenciación con el estado homocigota (HbCC), ya encontrados en Costa Rica.

Habiéndose establecido la identificación de la HbS y la HbC, así como de la HbF por electroforesis en agar citrato, se retorna a los patrones obtenidos en acetato de celulosa. Se pueden identificar ahora, con un grado razonable de certeza, los patrones de dos condiciones heterocigotas, HbAS y HbAC. En ambos casos la HbA es el mayor componente; por ejemplo, una pequeña cantidad de HbF y ausencia de HbA es sugestivo del estado homocigota para esta Hbs; sin embargo, como se señaló antes, algunos casos de HbS (o C) β talasemia están asociados con ausencia completa de HbA, y estas no pueden ser diferenciadas electroforéticamente del patrón del estado homocigota para HbS (o C). Por otro lado, la presencia de una fracción mayor de la

variante y una pequeña cantidad de HbA, es patognómico de HbS (o HbC) - β^+ -talasemia. La HbA₂ suele estar incrementada en la β talasemia heterocigota, pero no es demostrable en la presencia de HbC, de la cual la HbA₂ es inseparable por vía electroforética.

Desafortunadamente, la electroforesis en agar citrato no es de ayuda en la diferenciación de la HbA₂, que se mueve en forma similar o ligeramente más rápido que la HbA. Otra condición es que la HbS (o C) comprende la mayor fracción sin HbA, pero con grandes cantidades de HbF en el estado doble heterocigótico para HbS (o C) y para persistencia hereditaria de HbF (PHHbF) o S/ δ β^0 talasemia. La confirmación de la presencia de PHHbF depende de encontrar, mediante el método de Betke y Kleihauer, la HbF distribuida uniformemente dentro de todos los eritrocitos.

Las dos variantes más corrientes semejantes a la HbC, que migran en forma parecida a esta, son la HbE ($\beta^{26 \text{ glu-lis}}$) y la HbO ($\beta^{121 \text{ glu-lis}}$). La HbE se mueve con la HbA en electroforesis en gel de agar-citrato, mientras que la HbO presenta una posición electroforética ligeramente más catódica que la A y con una morfología peculiar que le da a la migración el aspecto de un "embudo", cuyo cono se dirige el cátodo (migra entre la HbA y la HbS). Estos patrones, por lo tanto, los diferencian de forma sencilla de la HbC. Puntos adicionales de diferenciación son: que la HbO se mueve ligeramente más rápido hacia el ánodo en electroforesis en acetato de celulosa, mientras que la HbE a menudo (pero no siempre) se presenta en un porcentaje más bajo (22-30%). En apariencia, esta es la misma situación que se presenta en los hemolizados de personas con anemia por Hbs SO o SE. En el último caso, la HbS es la fracción mayor; pero en la anemia producida por HbSO o HbSC hay cantidades similares de HbS y O (o C). La HbC Harlem, que se mueve como la HbC en acetato de celulosa, se diferencia claramente en electroforesis en agar-citrato, al migrar como HbS por la sustitución $\beta^{6 \text{ glu-val}}$.

Entre las variantes que se mueven en forma parecida a la HbS en electroforesis en acetato de celulosa, se encuentra la HbD Los Angeles (Punjab) ($\beta^{\text{glu-val}}$), la cual es importante desde el punto de vista clínico. Esta variante está presente en aproximadamente 3% de los Sikhs del área de Punjab de la India y en forma esporádica en muchos otros grupos, en particular ingleses, quienes estuvieron asociados con la India por muchos años. Además, se ha visto en alemanes, mexicanos y negros. Su presencia en combinación genética con HbS produce anemia hemolítica, llamada anemia por HbS-D, que puede confundirse fácilmente con HbSS, debido a que las dos son indistinguibles en tampón a pH alcalino. Sin embargo, en electroforesis

en agar-citrato, la migración de la HbSD se asemeja a la de la HbAS, debido a que la HbD migra igual que la HbA.

Las Hbs Korle-Bu y G Philadelphia que se han encontrado en Costa Rica, corren en pH 8.6, igual que la HbS, pero al migrar en agar-citrato pH 6.2 se separan en la posición de la HbA.

Las tres variantes de "movimiento" rápido de cadenas β , en orden de incremento de movilidad anódica en electroforesis en acetato de celulosa son: HbK, HbJ y HbN. La inocua HbK Woolwich ($\beta^{132\text{lis-gin}}$) es la tercer variante hemoglobínica adulta más frecuente en el Oeste de África. Esta exhibe una movilidad inusual en electroforesis en agar citrato, donde se mueve con la HbF; por esa razón es fácil de identificar. Otra Hb adulta, la rara Hb Hope, también migra con la HbF a pH ácido, pero como la A en acetato.

En electroforesis en acetato de celulosa a pH 8.4, la HbJ Baltimore ($\beta^{16\text{gil-asp}}$) se mueve más anódicamente que la HbK, mientras que la HbN Baltimore ($\beta^{95\text{lis-glu}}$) migra todavía más rápido hacia el ánodo. Otras variantes de HbJ y N también exhiben estas modalidades, y todas las que se han visto en Costa Rica se mueven con la HbA en electroforesis en agar-citrato.

La HbI, otra sustitución lis-glu (esta vez en cadena α 16), también es una Hb de movilidad rápida, como se esperaría por la sustitución de lisina. Como muchas variantes de cadenas α en la condición heterocigota, se encuentra presente en una concentración de menos de 25%. Esta se mueve con la HbA en electroforesis en gel de agar-citrato.

Las dos únicas Hbs que presentan cadenas tetraméricas, Bart (γ_4) y H (β_4), también poseen movimiento rápido en electroforesis en acetato de celulosa. La Hb Bart se mueve en la misma forma que la HbN, mientras que la HbH se mueve como la HbI o ligeramente más rápido. La HbH se separa pobremente de la HbA en agar-citrato, mientras que la Hb Bart forma una cola sobre la HbF, por lo que su presencia puede ser a menudo confirmada por electroforesis en agar citrato. La electroforesis en acetato a pH 7.0, sirve para confirmar la identidad de Hb Bart y HbH, pues son las únicas rápidas que se mueven hacia el ánodo.

Para la identificación de la HbG Philadelphia, se debe tener presente que esta es una variante hemoglobínica de cadenas α , en contraste con las Hbs S y C, las cuales son variantes de cadenas β . Debido a que las Hbs A, F y A₂ normales poseen cadenas α , son afectados por una anomalía de cadenas α ; un individuo que hereda una anomalía de estas α , here-

da, por lo tanto, tres variantes hemoglobínicas. En el adulto, la mayor parte de las variantes de cadenas α se combina con las cadenas β normales de la HbA y esta combinación constituye la mayor fracción de las tres variantes. Por lo general, la HbF en el adulto se encuentra en cantidades tan pequeñas -menos del 2%- como para ser detectada por electroforesis, por lo que la variante de HbF a menudo no se ve, pero es fácilmente evidenciable en un hemolizado de un recién nacido. La HbA₂, la tercera Hb normal, se encuentra en concentraciones aproximadas al 3% de la Hb total y, por lo general, se demuestra electroforéticamente. En presencia de una variante de cadenas α , las cadenas δ de la HbA₂ se dividen más o menos igual entre las cadenas α normal y su variante. Como resultado, la cantidad de HbA₂ normal puede ser visiblemente reducida, y una pequeña fracción llamada "A₂ extra", puede verse en electroforesis en acetato de celulosa, en especial después de teñirse con bencidina. La "A₂ extra" a menudo evidencia la presencia de una variante de cadena α . En el caso de la G Philadelphia, esta se llama G₂ y consiste de (α 68 asn-lis) combinadas con las cadenas δ de la HbA₂. Electroforéticamente, la HbG₂ migra detrás de la HbA₂ normal, casi a la misma distancia a la que se mueve la HbG Philadelphia de la HbA. Si además se asocia otra variante de cadenas α que se mueve más anódicamente, tal como la HbI (α 16 lis-glu), la "HbA₂ extra" (llamada HbI₂) puede no ser demostrable mediante electroforesis, debido a que se mueve con la HbA y solo puede ser separada por técnicas especiales.

Una peculiaridad relacionada con la presencia simultánea de una variante de cadenas α y una de cadena β es la formación de una Hb híbrida que contiene ambas anomalías. Así, el hemolizado de una persona que hereda un gen para HbS y un gen de HbG Philadelphia, presenta tres Hbs mayores: la HbA normal; una fracción que contiene HbG Philadelphia y HbS (que se mueven juntas en electroforesis alcalina); y una fracción con la movilidad de HbC, que en los análisis consiste de las cadenas α anormales de la HbG Philadelphia y la cadena β anormal de la HbS. La "HbA₂ extra" no es visible en este caso, pues migra igual que el híbrido.

En el caso de la heterocigosidad combinada para la HbA, G Philadelphia y C, la muestra se separa en cuatro fracciones mayores, consistentes de HbA, HbG Philadelphia, HbC y una molécula híbrida catódica a la HbC, que contiene las cadenas α anormales de la HbG Philadelphia y las cadenas β anormales de la HbC. En electroforesis en agar-citrato, el hemolizado de un heterocigoto para la HbA, S y G Philadelphia semeja aquellos heterocigotos para HbA y S, debido a que la HbG Philadelphia migra con la HbA. Las muestras de

heterocigotos para Hbs A, C y G son semejantes a los heterocigotos para Hbs A y C. De nuevo, la HbG Philadelphia migra con la HbA.

Variantes similares a HbA

Si las alteraciones bioquímicas y de cargas no inducen cambios significativos en las globinas afectadas, la migración por electroforesis es similar a la HbA. En Costa Rica dos ejemplos de estos casos son la Hb Raleigh y la Hb New York. La primera se pudo diferenciar por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), mientras que la segunda no.

Por otra parte, vale la pena señalar que existen variantes hemoglobínicas con patrones indistinguibles de migración electroforética a pH alcalino o ácido y en diferentes medios de sostén, que solo pueden diferenciarse por técnicas de isoelectroenfoque, HPLC, electroforesis capilar y otros métodos como espectrometría de masas. Ejemplo de ello es la HbS-antilles, prácticamente indiferenciable de la HbSA utilizando métodos convencionales de electroforesis.

CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

La cromatografía líquida de alta resolución es una técnica que involucra la separación de una muestra disuelta en una fase móvil (que puede ser gas, líquido o fluido supercrítico) y una fase estacionaria (que puede ser un sólido o un líquido soportado en un sólido). Además, permite la separación física de la muestra disuelta en un líquido que se inyecta a una columna empacada con partículas pequeñas y separada en sus diferentes compuestos.

Esta técnica tiene como ventaja una alta sensibilidad, debido a que puede detectar sustancias en el orden de los picogramos o nanogramos. Es además muy flexible, ya que se pueden determinar diferentes moléculas al cambiar los sistemas de separación, el tipo de columna o el detector. Por lo general, el HPLC se utiliza para el análisis de biomoléculas y compuestos orgánicos, aunque sus aplicaciones son muy diversas, por cuanto resulta de gran utilidad en la identificación de macromoléculas, productos farmacéuticos y separación de ácidos nucleicos.

La separación de las proteínas va a depender, entre otros factores, de: el tipo de columna, el tamaño de esta, el tipo de detector y los sistemas de separación, principalmente.

Metodología

En el caso de la separación de hemoglobinas, esta varía según las fases móviles utilizadas, el tipo de columnas, los tiempos, etc.

En el CIHATA se utiliza un equipo Perkin Elmer, Series 200 automatizado. El tipo de columna es de intercambio iónico tipo CM.

Las fases móviles utilizan gradientes de Bis-tris 1,5 mM. Es importante tener un sistema de precolumna protectora y preparar adecuadamente los bemolizados para eliminar restos de estromas celulares. En la Figura N° 5 se muestra un esquema largo de separación de algunas hemoglobinas.

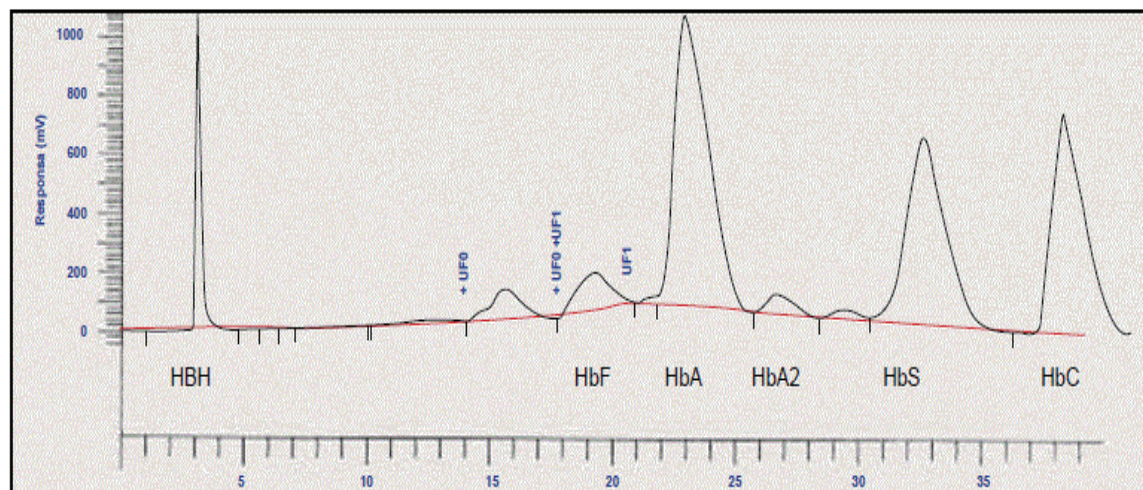


Figura N° 5. Esquema de separación de hemoglobinas mediante HPLC en sistema de separación de Bis-Tris.

Ventajas

En la separación de hemoglobinas, el HPLC posee la ventaja de separar variantes lentas, como la S y la C, de otras que migran en posición similar en la electroforesis convencional. Además, detecta hemoglobinas rápidas. Otra ventaja es que permite separar la HbA₂ de la HbC, lo cual no se puede realizar electroforéticamente o mediante columnas de intercambio iónico de DEAE celulosa. Asimismo, permite cuantificar cualquiera de los distintos picos de hemoglobina, brindando a la vez información cualitativa y datos cuantitativos, de los cuales son muy importantes la estimación de la HbF y la A₂ para el diagnóstico de talasemias. Se ha utilizado la cuantificación de HbS en algunos casos en que ha sido necesario evaluar la disminución de esta hemoglobina por crisis severas drepanocíticas, donde se requiere trasfundir al paciente para hemodiluir la HbS.

Es importante señalar que algunas variantes de hemoglobina migran en la misma posición de la HbA en electroforesis en acetato de celulosa, pero pueden identificarse al separarse por HPLC. Como ya se mencionó, la identificación de la Hb Raleigh se logró por la identificación de un pico proteico de cerca de un 40% en HPLC y no fue detectable en la electroforesis convencional.

La sensibilidad de la técnica permite además realizar cromatogramas de cultivos de colonias de progenitores eritroides, a partir de pequeñas cantidades. Otra ventaja es que elimina la necesidad de cuantificar por otros métodos la HbF y la A₂, una vez efectuada la corrida electroforética.

De igual manera, permite identificar y cuantificar modificaciones postraduccionales de la hemoglobina, como la formación de aductos hemoglobina-acetaldehído derivados del metabolismo etílico y la glicosilación en pacientes diabéticos. En el caso de la hemoglobina glicosilada, se observan no solo la glicosilación de la hemoglobina normal, sino también de variantes estructurales y de la Hb fetal. Al respecto, cabe mencionar que en el mercado existen técnicas y equipos diseñados para la medición de Hb glicosilada por técnicas rápidas de HPLC.

Finalmente, la versatilidad del HPLC le permite ampliar su utilidad a otros campos de la hematología (mioglobina, haptoglobinas, etc.), así como a una variedad enorme de proteínas, metabolitos y medicamentos.

Desventajas

- Dependiendo de los sistemas utilizados, las corridas pueden tomar bastante tiempo (30, 40, 100, 120 minutos), aunque con el uso de columnas cada vez más cortas y eficientes estos tiempos se acortan. No obstante, aunque algunos procesos son lentos, esta desventaja se puede obviar al ser automatizados muchos de los equipos, lo cual permite preparar las muestras e incluso procesarlas de noche.
- Existe un mayor consumo de las soluciones tampones, en comparación con las electroforesis.
- Requiere ciertos insumos (viales) que pueden encarecer las pruebas.
- En el caso de la cromatografía de investigación, las muestras deben prepararse especialmente mediante ultracentrifugación o filtración para obtener resultados óptimos.

La recomendación es poder utilizar al menos dos métodos bioquímicos diferentes que permitan analizar distintas propiedades de la hemoglobina

BIBLIOGRAFÍA

- Bain B. Laboratory techniques for the identification of abnormalities of globin chain synthesis. En: Bain B. Hemoglobinopathy diagnosis. Oxford: Blackwell; 2001. p. 20-45.
- Campbell M, Henthorn J, Davies S. Evaluation of cation-exchange HPLC compared with isoelectric focusing for neonatal hemoglobinopathy screening. Clin Chem 1999; 45(7): 969-975.
- Cartín W, Mora L, Valverde K, Valverde B, Suarez C, Jiménez R. Hemoglobin perth in Costa Rica. Pediatric Blood & Cancer 2009; 53(2): 243.
- Cartín W, Suárez C, Mora L, Valverde K, Valverde B, Jensen E, *et al.* Primer caso de hemoglobina Köln (codon98 GTG>ATG) en Costa Rica. Acta Med Costarric 2010; 52(1): 40-41.
- Edward HL, Pisani LA, Rodríguez WE, Chaves J, García J, Harris NS, *et al.* Hb Youngstown [β 101(G3)Glu→Ala; HBB: c.305A>C]: An unstable hemoglobin variant causing severe hemolytic anemia. Hemoglobin 2014; 38(6): 381-384.
- Efremov GD, Huisman THJ. The laboratory diagnosis of hemoglobinopathies. Clin Haematol 1974; 3: 527.
- Efremov GD. Starch gel electrophoresis. En: Schmidt RM, Huisman THJ, Lehmann H. The detection of hemoglobinopathies. Boca Raton: CRC Press Inc.; 1973. p. 7-11.

Giardine B, Borq J, Viennas E, Pavlidis C, Moradkhani K, Joly P, *et al.* Update of the HbVar database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations. *Nucleic Acids Res* 2014; 42: 1063-1069.

Helena Laboratories. Hemoglobin electrophoresis procedure. (Versión en Internet). Texas. Consultada el 10 de junio de 2014, en: <http://www.helena.com/Procedures/Pro015%20Rev6.pdf>

Huisman THJ, Carver, MF, Efremov GD. A syllabus of human hemoglobin variants. 2 ed. Augusta, Georgia: The Sickle Cell Anemia Foundation; 1998.

Kutlar A, Huisman THJ. The detection of hemoglobinopathies. En: Hommes F. *Techniques in diagnostic human biochemical genetics: a laboratory manual*. New York: J Wiley & Sons; 1991. p. 519-560.

McFarlane A, Cartín W, Suárez C, López J, Chaves K, Verhovsek M. Investigation of low oxygen saturation and anemia in a pediatric patient from Costa Rica. XXVth Symposium on Technological Innovations in Laboratory Hematology. Nice, Francia: ISLH; 2012.

McFarlane A, Warkentin T, Cartín W. A novel sickling hemoglobinopathy. *N Engl J Med* 2011; 365(16): 1548-1549.

Moo-Penn WF, Jue DL, Johnson MH, Bechtel KC, Patchen LC. Hemoglobin variants and methods used for their characterization during 7 years of screening at the Center for Disease Control. *Hemoglobin* 1980; 4(3-4): 347-361.

Papadea C, Cate JC. Identification and quantification of hemoglobins A, F, S and C by automated chromatography. *Clin Chem* 1996; 42(1): 57-63.

Rodríguez WE, Castillo M, Chaves MA, Sáenz GF, Gu LH, Wilson JB, *et al.* Hb Costa Rica or $\alpha 2\beta 277(\text{EF}1)$ His-Arg: the first example of a somatic cell mutation in a globin gene. *Human genetics* 1996; 97(6): 829-833.

Rodríguez WE, Villalobos J, Salas P, Hong L, Chui D. Hemoglobina Raleigh en Costa Rica detectada como un valor falsamente elevado de hemoglobina glicosilada. *Rev Biomed* 2012; 23(1): 33-38.

Sáenz GF, Moreira J. Laboratorio de hemoglobinopatías. Manual Latinoamericano. Costa Rica: Ministerio de Salud; 1980.

Sáenz GF, Rodríguez WE. Estudio de la hemoglobina por electroforesis y por cromatografía líquida de alta resolución. En: Sáenz GF. *Hematología analítica*. 5 ed. San José, Costa Rica: EDNASSS; 2008. p. 649-661.

Schneider RG, Hosty TS, Tomlin G, Atkins R. Identification of hemoglobins and hemoglobinopathies by electrophoresis on cellulose acetate plates impregnated with citrate agar. *Clin Chem* 1974; 20(1): 74-77.

Weatherall DJ (editor). *Abnormal haemoglobins (Clinics in haematology)*. Philadelphia: W. B. Saunders; 1974.

PRUEBAS DE ESCRUTINIO PARA LA DETECCIÓN DE HEMOGLOBINA S

Dr. German F. Sáenz Renauld
Dr. Walter E. Rodríguez Romero

INTRODUCCIÓN

La hemoglobina S (HbS) es una proteína anormal que genera cambios morfológicos en los eritrocitos en condiciones de bajo oxígeno. La detección en el laboratorio de esta es de suma importancia, ya que es la responsable de la mayoría de los tipos de anemia falciforme.

Para el estudio de las hemoglobinas anormales, se recomienda utilizar al menos dos técnicas distintas, que pueden ser muy sencillas o complejas. Específicamente, en el caso de las pruebas de escrutinio para la HbS, las más utilizadas se basan en la propiedad de la HbS de ser insoluble en estados de hipoxia, y suelen ser aplicadas junto con otras técnicas.

PRUEBA DE SOLUBILIDAD DE LA Hb (Método de Itano, Modificado por Nalbandian et al)

En 1935 Itano encontró que la HbS en el estado reducido (desoxigenado) era muy insoluble en una solución tampón de fosfatos de alta molaridad con ditionito de sodio. En estas condiciones se forman tactoides, los cuales refractan y reflejan la luz y producen una solución turbia. En las mismas condiciones de la prueba, las Hbs A, D, F, C y muchas otras más no muestran ningún cambio en la solubilidad.

Además de la HbS (6 glu-val), se comportan como insolubles las Hbs C-Harlem (S+β 73 asp-asn), la C-Zinguinchor (S+β 58 pro-arg), la S-Travis (S+β 142 ala-val), la F-Alexandra (δ 12 Treo-lis), entre otras.

Reactivos

Solución tampón de reserva 2,795 M: KH_2PO_4 (1,18 M) y K_2HPO_4 (1,615 M)

Se disuelven 160,48 g de KH_2PO_4 y 218,88 g de K_2HPO_4 en 800 ml de agua destilada, y se lleva a un volumen final de un litro.

Solución tampón de trabajo (2,24 M)

Se agregan 20 g de ditionito de sodio y 5 g de saponina a 800 ml del tampón de reserva, y se lleva a un

volumen final de un litro. Por supuesto, los volúmenes de la solución de trabajo se prepararán de acuerdo con el trabajo semanal que se espera realizar. De esta suerte, es práctico alistar cada semana unos 100 ml y guardarlos en la refrigeradora a 4 °C.

En el CIHATA se ha modificado ligeramente el procedimiento anterior de preparación del reactivo de trabajo, a fin de hacer menos oneroso el trabajo diagnóstico.

Preparación del tampón de trabajo (2,24 M) (CIHATA)

KH_2PO_4 (anhidro)	33,788 g
K_2HPO_4 (anhidro)	59,338 g
Saponina blanca	2,50 g
Agua destilada c.s.p.	250 ml

La saponina debe añadirse al final, para evitar la formación de burbujas.

Esta solución tendrá un pH de 6.7 ± 0.1 y es estable bajo refrigeración al menos un par de meses.

Al momento de efectuar la prueba de solubilidad, se debe añadir al tubo de prueba la cantidad de ditionito requerida, tal y como se indica en el método que a continuación se detalla.

Procedimiento

- Se marcan tres tubos 13 x 75 mm como P (paciente), C+ (control positivo HbAS) y C- (control negativo HbA).
- Se pipetea 2 ml de la solución tampón de trabajo + saponina; se añaden 40 mg de ditionito de sodio (hidrosulfito de sodio - $Na_2S_2O_4$) y se mezcla bien. Este reactivo se usa a temperatura ambiente.
- Se agregan 0,020 ml de sangre total (o la capa roja de un capilar de microhematocrito) al tubo respectivo. Se mezcla muy bien y se deja en reposo por cinco minutos.
- Se vuelven a mezclar los tubos y se colocan frente a una tarjeta blanca, exactamente a 2 cm de esta, que lleve impresas unas 10 líneas negras horizon-

tales, con una separación de 5 mm entre línea y línea.

Interpretación

Una solución turbia indica, de forma presuntiva, la presencia de HbS. En esta situación, las líneas negras no se observarán a través de la solución (prueba positiva para HbS). Por el contrario, una solución transparente se reporta como prueba negativa.

Observaciones

- Si el valor Hto del paciente es menor a 20%, se usará doble volumen de sangre (0,040 ml); si es mayor de 50%, se utilizará doble volumen del tampón (4 ml).
- Se puede usar hemolizado fresco entre 9 y 11 g/dl de Hb. En este caso, no será necesario agregar saponina en la solución de trabajo.
- Si los controles no trabajan adecuadamente, debe descartarse la solución de trabajo.
- La presencia de paraproteínas puede dar una prueba falsa positiva. Si se sospecha esta interferencia, se deben utilizar glóbulos lavados o hemolizado.
- Con la práctica no será necesario pesar los miligramos de ditionito antes de efectuar la prueba, pues la cantidad para cada tubo es aproximadamente lo que toma la punta de una espátula pequeña.
- Esta prueba puede hacerse a la cabecera del paciente con una simple gota de sangre.
- Esta prueba presuntiva no diferencia el carácter o rasgo (heterocigoto) AS de la condición homocigota (SS) o de cualquier otro síndrome drepanocítico (S/beta-tal, SC, S/PHHbF, SO, SD, etc.).

Condiciones que causan pruebas de solubilidad falsamente negativas en la prueba presuntiva con sangre total

- Cantidad inadecuada de sangre (por ejemplo: pacientes anémicos con menos de 8 g de Hb/dl).
- Deterioro de los reactivos o cantidad inadecuada de ditionito de sodio
- Sangre de recién nacidos o de niños dentro de los primeros meses de vida, que posean los fenotipos AS o SS.
- Error técnico por lectura inadecuada de la prueba.
- Transfusión de sangre normal a pacientes que posean la tara drepanocítica (HbAS).

Condiciones que causan pruebas de solubilidad falsamente positivas en la prueba presuntiva con sangre total

- Uso de sangre policitémica o una cantidad excesiva de sangre con respecto al reactivo.

- Presencia de proteinemia anormal (enfermedad renal, mieloma, crioglobulinemia, enfermedad de Waldeström, LED).
- Hbs anormales, como C Harlem, F Alexandra, Bart, S-Travis, C-Zinquinchor, S-Oman, S-Antilles, entre otras.
- Transfusiones recientes y profusas de sangre que contienen HbS (por ejemplo, las donaciones con HbAS).
- Marcadas leucocitosis, leucémicas o no.

PRUEBA DE SOLUBILIDAD DIFERENCIAL CON UREA (Prueba confirmatoria) (Método de Henry et al)

La urea interfiere rompiendo los enlaces hidrofóbicos que se forman entre de las valinas de las posiciones 1 y 6 de las cadenas β^S , las cuales son responsables de que la HbS polimerice en el estado desoxigenado. Se recomienda hacer este análisis cuando la prueba de solubilidad es positiva, para verificar si la Hb que dio positivo el análisis presuntivo es HbS, o si se trata de otras raras Hbs que son insolubles en el estado desoxigenado, debido a sus características estructurales (Bart, F-Alexandra).

La prueba de solubilidad con urea tiene especificidad submolecular para la mutación β^S , lo que permite detectar dicha anomalía; en esta forma se discriminan las otras Hbs que dan positivo el análisis de rastreo.

Reactivos

Urea (3M)	180 g
Solución tampón de fosfatos	2,24 M
con $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ y saponina, c.s.p.	1.000 ml

Procedimiento

- Se pipetea 2 ml de solución tampón urea-ditionito en un tubo de ensayo de 12 x 75 mm.
- Se agregan 0,02 ml de sangre (colectada con EDTA) y se mezcla por inversión.

Se deja a temperatura ambiente durante cinco minutos y luego se observan las líneas de una tarjeta que se ha colocado a 3 cm del tubo.

Un procedimiento más práctico consiste en añadir al mismo tubo original de la prueba presuntiva positiva (la que dio turbidez), 0,4 g de urea en polvo y mezclar muy bien hasta disolverla. Luego se deja en reposo y se lee a los cinco minutos, en las mismas condiciones señaladas anteriormente.

Interpretación

La HbS (6 glu-val) que antes había dado turbiedad, se transparentizará (prueba confirmatoria con urea positiva para HbS), lo cual dará una probabilidad casi del 100% de que lo que se encontró en un inicio (turbiedad) fue HbS.

Otras Hbs anormales permanecerán positivas con urea (turbiedad persistente), como la HbH, la Hb Bart y la Hb Alexandra (Figura N° 1).



Figura N° 1. Patrones positivos para HbS con ditionito de sodio y con urea.

PRUEBA DE SOLUBILIDAD CUANTITATIVA (Goldberg, modificada por el CIHATA)

Esta determinación puede ser importante si no se dispone de un método como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para cuantificar el porcentaje de HbS.

Procedimiento

- Se colocan 1,8 ml del tampón de fosfatos 2,24 M con saponina y ditionito en un tubo de ensayo pequeño.
- Se añaden 0,2 ml de sangre total. Se mezcla muy bien y se deja en reposo por cinco minutos (también se pueden utilizar hemolizados entre 9 y 11 g/dl).
- Se mezcla de nuevo por inversión y se filtra a través de papel de filtro Whatman N° 2 o equivalente.
- Se agregan 0,20 ml del filtrado a un tubo en donde previamente se han depositado 4,8 ml de Drabkin modificado. Se mezcla bien.
- Se prepara un patrón de 100% Hb, diluyendo 0,020 ml de la sangre total de prueba (o hemolizado) en 5 ml de solución Drabkin. Se deja en reposo por cinco minutos.
- Se lee la A de la prueba y del patrón a 540 nm, llevando a 100% de transmitancia con la solución Drabkin o agua destilada.

Cálculos

	D.O. muestra x 100
% de solubilidad =	D.O. patrón

Interpretación

- Fenotipo normal AA = 90-100% solubilidad.
- Fenotipo AS = 23-35%.
- Fenotipo SS = 3-10%.
- Fenotipo SC = 13-30%.
- Fenotipo S/β-tal = 3-10%.

Comentarios finales de las pruebas de solubilidad de la HbS

Estas son de escrutinio y muy valiosas en la detección rápida de portadores de HbS, como también de pacientes con síndromes drepanocíticos de importancia clínica (SS, SC, S/β-tal). Sin embargo, la caracterización fenotípica requiere siempre de un hemoglobinograma completo, el cual incluye la electroforesis como método de escrutinio para Hbs anormales, HPLC y electroforesis capilar.

Además, la prueba de solubilidad es relevante cuando se aprecia una banda en la región de la HbS, ya sea por electroforesis u otros métodos, y se desee descartar que se trate de otra hemoglobina lenta distinta.

PRUEBA DE INDUCCIÓN DE DREPANOCITOS (Daland y Castle)

La forma drepanocítica de los eritrocitos resulta de la formación de tactoides rígidos por las moléculas de HbS desoxigenadas. Estas estructuras deforman el estroma y tienen como consecuencia la producción de la célula semilunar o en Hoz clásica. Para que se produzca el fenómeno, debe haber por lo menos 20% de HbS (más de 7% de CHCM).

Como al nacer el niño tiene un porcentaje elevado de Hb fetal, los eritrocitos de los lactantes poseedores de HbSS difícilmente adoptan la forma semilunar. A la edad de tres o cuatro meses, la cantidad de Hb fetal disminuye y es sustituida por las formas adultas de Hb (HbA, HbA₂). Si la herencia ha sido de HbS,

al aumentar el porcentaje de esta se provocará la producción de formas drepanocíticas.

El fundamento del método consiste en inducir un medio hipóxico a través del metabisulfito de sodio, producir la polimerización de la HbS y la deformación del eritrocito. Si la preparación se deja suficiente tiempo sin oxígeno, todos los pacientes con HbAS (heterocigoto) tomarán la forma semilunar. Claro está que para provocar la drepaformación en los heterocigotos se necesita una disminución mayor del oxígeno que en los homocigotos. Por lo tanto, las pruebas antes descritas no permiten diferenciar entre la condición homocigota (SS), el rasgo AS y otros síndromes de HbS (SF, SC, SD, S Korle Bu). Para una definitiva resolución del problema, debe recurrirse a la electroforesis.

Reactivos

Metabisulfito de sodio al 2%

Metabisulfito de sodio ($\text{Na}_2 \text{S}_2 \text{O}_5$)	0,2 g
Agua destilada c.s.p.	10 ml

Procedimiento

- Se colocan dos gotas de la solución de metabisulfito y una gota pequeña de la sangre en estudio sobre un portaobjetos. Se mezcla bien y se cubre con un portaobjetos.
- Se efectúa una ligera presión sobre el cubreobjetos y se elimina el exceso de líquido con papel de filtro.
- La preparación se coloca en una cámara húmeda y se observa la formación de drepanocitos cada 10 minutos. No se debe tomar como negativa la preparación antes de 24 horas.

Notas:

- La solución de metabisulfito se debe preparar inmediatamente antes de su uso, ya que las soluciones viejas pueden dar falsos negativos.
- Es importante montar un control de salina con sangre del mismo paciente, lo cual es muy útil cuando se está en presencia de una eliptocitosis o de una marcada poiquilocitosis.
- En vista de la facilidad (por error técnico) de obtenerse falsos negativos (y también falsos positivos), no debería usarse esta prueba para la detección de HbS; en ese caso la de solubilidad es mucho más adecuada.

Comentarios

En las personas homocigotas, frecuentemente de un 10% a un 20% de los eritrocitos aparecen extensiones de sangre falciformes (drepanocitos irreversibles),

sin haber sido provocado el fenómeno *in vitro*. Esto se debe a que la tensión de O_2 fisiológica es insuficiente para mantener toda la Hb soluble y, por lo tanto, la forma normal de los eritrocitos HbSS.

La inducción positiva de drepanocitos indica con seguridad casi completa que se está en presencia de eritrocitos con HbS. Sin embargo, eritrocitos que contienen HbC-Harlem, S-Antilles, C-Zinguinchor y S-Travis, también adquieren esta forma falciforme, porque poseen la misma mutación 6 valina, en unión de otra; no obstante, por fortuna estas hemoglobinopatías son raras en extremo.

BIBLIOGRAFIA

Dalan GA, Castle WB. A simple method for demonstration sickling of red blood cells: the use of reducin agents. J Lab Clin Med 1948; 33(9): 1082-1088.

Díaz P, Cervantes AR, Ramos R, Presno JM, Cervantes R. Susceptibilidad de generar drepanocitos en muestras de pacientes heterocigotos para hemoglobina S (rasgo falciforme) que padecen diabetes mellitus tipo 2. Gac Med Mex 2015; 151: 757-763.

Goldberg CA. The ferrohemoglobin solubility test. Clin Chem 1958; 4(2): 146-149.

Henry RL, Nalbandian RM, Nichols BM, Camp R, Conte NF, Wolf PL. Modified sickledex tube test: a specific test for S hemoglobin. Clin Biochem 1971; 4(1-6): 196-207.

Itano HA. Solubilities of naturally occurring mixtures of human hemoglobin. Arch Biochem Biophys 1953; 47(1): 148-159.

Nalbandian RM, Nichols BM, Camp FR, Lusher J, Conte NF, Henry RL, *et al.* Dithionite tube test. A rapid inexpensive technique for the detection of hemoglobin S and non-S sickling hemoglobin. Clin Chem 1971; 17(10): 1028-1032.

Sáenz GF, Moreira J. Laboratorio de hemoglobinopatías. Manual Latinoamericano. Costa Rica: Ministerio de Salud; 1980.

Rodríguez WE, Sáenz GF. Pruebas de escrutinio para detección de hemoglobina S. En: Sáenz GF (editor). Hematología analítica. 5 ed. San José, Costa Rica: EDNASSS; 2008. p. 663-667.

Wild B, Bain B. Investigation of abnormal hemoglobins and thalassaemia. Lewis SM, Bain B, Bates I. Dacie and Lewis practical haematology. 10 ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2006. p. 292-294.

PREPARACIÓN DE HEMOLIZADOS PARA EL ESTUDIO DE HEMOGLOBINAS ANORMALES, TALASEMIAS Y HEMOGLOBINAS INESTABLES

Dr. German F. Sáenz Renauld
Dr. Walter E. Rodríguez Romero

INTRODUCCIÓN

Para los estudios hemoglobínicos convencionales, el anticoagulante de elección es el EDTA, aunque la sangre se puede colectar con heparina, citrato y oxalatos. También puede obtenerse en capilares heparinizados y hasta en papel filtro fino para estudios en programas de tamizaje neonatal. Cualquiera que sea el procedimiento seleccionado, la muestra de sangre siempre deberá mantenerse a baja temperatura (4 °C) hasta su procesamiento definitivo.

PREPARACIÓN DEL HEMOLIZADO COMPLETO (SINGER ET AL)

El hemolizado completo es el procedimiento de elección para los estudios por hemoglobinopatías, ya que disminuye fuentes de error producidas por otras proteínas o por formación de metahemoglobina (metaHb).

El procedimiento es el siguiente:

- Se centrifuga la sangre anticoagulada a 3.000 rpm (aproximadamente 500 g) durante cinco minutos; se remueve el plasma y se lavan los eritrocitos tres veces con solución salina al 0,85%. Después del último centrifugado, se remueve el sobrenadante de solución salina y se mide el volumen de células empacadas.
- Por cada mililitro de células rojas empacadas, se adiciona un mililitro de agua destilada (mejor aún, 1 ml de la solución hemolizante de EDTA-KCN -ver más adelante-) y se agita de forma vigorosa por dos minutos. Luego, se añade cloroformo (u otros solventes, como tetracloruro de carbono (CCl_4) o tolueno) en una proporción similar a la mitad del total del hemolizado. Se agita vigorosamente por unos tres minutos (o en un vortex por 30 segundos) y se centrifuga por 20 minutos a 3.000 rpm. Si la hemólisis es incompleta -lo cual es frecuente cuando hay muchas células en diana o drepanocitos-, la mezcla debe congelarse y descongelarse. Ante sospecha de HbH o de otras Hbs inestables, el agitado vigoroso con solventes orgánicos puede precipitarlas y dar falsos negativos. Esto puede

ser obviado lizando las células lavadas con cuatro volúmenes de agua destilada y centrifugando a 15-20.000 g a 4 °C por 20 minutos. Usar este hemolizado para las pruebas pertinentes.

- El hemolizado preparado con CCl_4 o cloroformo queda encima de la capa de estroma y se recoge con una pipeta Pasteur. Por lo general, no hay necesidad de filtrarlo antes de su uso. La solución acuosa de oxiHb (HbO_2) que se obtiene debe ser de color rojo rubí y cristalina. Si el solvente fuera tolueno, este quedará en la porción superior del tubo.
- Se determina la concentración de hemoglobina (Hb) de los hemolizados y se ajusta su contenido a 10 g/dl, aplicando la fórmula $\text{ml X g/dl} = \text{ml X g/dl}$. Por ejemplo, si se tiene un hemolizado de 12 g/dl, el volumen del hemolizado original de 12 g/dl que se deberá diluir a un volumen final de 2 ml con agua destilada será de 1,66 ml, toda vez que $X \times 12 = 2 \times 10 = 1,66$; $X = \text{ml de hemolizado de 12 g/dl que se deben tomar para obtener 2 ml de hemolizado de 10 g/dl}$.
- El hemolizado preparado se conserva en refrigeración a 4 °C. Para mantenerlo por más tiempo se congela a -70 °C. Se puede añadir una gota adicional de KCN al 5% para mayor estabilidad y retardar la aparición de metaHb.

HEMOLIZANTE EDTA-KCN PARA PREPARACIÓN DE HEMOLIZADOS COMPLETOS O RÁPIDOS

Solución madre de EDTA

Se disuelven 40 g de EDTA (etilen-diamino-tetraacetato disódico) en un litro de agua destilada.

Solución de trabajo (EDTA-KCN)

Se mezclan 0,3 ml de la solución madre con 120 ml de agua destilada y se añaden 2 ml de una solución al 5% de KCN. Esta solución prevé la formación de metahemoglobina en el hemolizado y durante la electroforesis.

La solución de trabajo, que normalmente es la que se utiliza en la preparación de un hemolizado completo, se guarda en botella ámbar a temperatura ambiente o en refrigeración. Dicha solución se prepara cada semana, pues el cianuro se deteriora.

Hemolizante a base de saponina

- *Solución madre de saponina*: 1 g de saponina blanca (pura, grado certificado). Agua destilada c.s.p. 100 ml.
- *Solución de trabajo saponina-KCN*: diluir la solución madre 1:10 con agua destilada. Se agregan 2 ml de KCN al 3% por cada 100 ml de esta solución de trabajo. Se mezcla y se deja a temperatura ambiente o en refrigeración.

Hemolizado rápido

- *A partir de sangre total*: se centrifugan las muestras de sangre total a baja velocidad (1.500 rpm; aproximadamente 250 g) durante tres minutos; esto si no ha estado en reposo por varias horas. Se obtiene una gota del paquete de eritrocitos con la ayuda de una pipeta Pasteur y se coloca en un tubo de ensayo pequeño. Se agregan tres gotas de reactivo hemolizante por cada gota de sangre (concentración aproximada del hemolizado = 5 g/dl). Se mezcla durante 30 segundos en un vortex. De manera alternativa, se puede añadir una gota de Tritón X-100, a fin de hemolizar bien y mezclar.
- *A partir de un capilar de hematocrito*: luego de la lectura del valor hematocrito, se corta con la sierra el capilar, a efecto de eliminar el plasma. La porción de células empacadas se coloca en el fondo de un tubo que contiene dos gotas de cualquiera de los reactivos hemolizantes antes descritos. Se centrifuga la mezcla por cinco minutos a 3.000 rpm. Después, se mezcla el tubo en un vortex por unos dos minutos. La solución queda lista para la corrida electroforética de escrutinio.

Los hemolizados rápidos son fáciles de realizar, y no hay duda de que pueden utilizarse de rutina en cualquier laboratorio. Sin embargo, a pesar de ello y de que son muy útiles en los estudios poblacionales, no son del todo confiables para algunos estudios cuantitativos, ni para análisis estructurales.

En caso de que se requieran confirmar patrones de hemoglobina, siempre debe usarse hemolizado completo de Singer, que como posee KCN convierte la hemoglobina en cianometahemoglobina.

En la preparación de hemolizados incógnitas o para un control estable de los procedimientos electroforéticos (por ejemplo, un patrón C+S+F+A+J), se ha recomendado burbujear la mezcla (Hb + KCN) con monóxido de carbono (CO), para estabilizar aún más la solución de hemoglobina como carbonomonoxihemoglobina y poder congelar por muchos meses a -70 °C.

Si no hay refrigeración adecuada para el transporte de las muestras, la contaminación puede obviarse añadiendo una punta de espátula de clorometina al 1% y otra de glucosa en polvo al 99%, al momento de tomar la muestra de sangre.

Hemolizados con sangre coagulada

La sangre coagulada no debe usarse en la preparación de hemolizados, pues no permite efectuar todos los exámenes necesarios. Solo en casos excepcionales puede emplearse la siguiente técnica:

- a. Se centrifuga la sangre coagulada a 3.000 rpm por 10 minutos.
- b. Se lava el coágulo cuatro veces en solución de NaCl al 0,85%.
- c. El coágulo es forzado a través de una jeringa de 10 ml con o sin aguja, a un tubo de ensayo.
- d. Se centrifuga a 3.000 rpm durante cinco minutos y se retira el sobrenadante; los eritrocitos se lavan tres veces con NaCl al 0,85%.
- e. Luego se continúa igual (Singer o un método rápido).

Hemolizados para control electroforético

En todo estudio de Hbs anormales, es indispensable tener siempre a mano hemolizados de control que contengan al menos dos tipos de hemoglobinas conocidas (A y S, A y C o S y C). En el procedimiento que se señala a continuación, es posible contar siempre con un control de al menos cuatro hemoglobinas, y puede modificarse con el fin de incluir una Hb rápida, como sería cualquiera de las HbsJ.

Preparación de los hemolizados

1. Se obtienen muestras frescas de sangre con patrones AC, SS y FA (cordón). La fracción hemolizada de cada fenotipo se obtiene tal y como se señala en otros apartados de este capítulo (Singer).
2. Luego, se añade KCN, en una proporción de 0,05 ml de una solución al 0,65% por cada mililitro de hemolizado (10-14 g/dl), para estabilizar la solución como cianometahb (HiCN).

Preparación de los controles

1. La concentración de Hb se obtiene de cada uno de los hemolizados y se procede a efectuar electroforesis a cada uno de ellos para comprobar su patrón y pureza. La concentración de los hemolizados no debe diferir en más de 2 g/dl uno de otro.
2. Se mezclan volúmenes iguales de los tres hemolizados (AC, SS y FA).
3. Se realiza una electroforesis de este patrón o estándar a una alícuota de la mezcla. Si está muy concentrada, se debe hacer una dilución 1:2 y volver a efectuar una electroforesis. Finalmente, cuando el patrón electroforético CSFA es adecuado, se debe diluir la porción remanente de la mezcla y burbujear CO por unos 15 segundos.
4. Pequeñas alícuotas del control se distribuyen en botellitas con tapón de hule y se guardan a 4 °C o en congelación. En ocasiones se elimina el tapón de hule y se hace burbujear de nuevo varias veces CO en el vial que se encuentra en uso.

DETERMINACIÓN DE HEMOGLOBINAS INESTABLES

Las hemoglobinas inestables se asocian con anemias hemolíticas inexplicables. Los eritrocitos con alguna de estas variantes forman cuerpos de inclusión (Heinz) producto de la desnaturalización de las cadenas de globina. Al respecto, cabe mencionar que los eritrocitos de una muestra de sangre fresca pueden formar mayor número de cuerpos de Heinz en presencia o ausencia de fenilhidrazina, que los eritrocitos de una muestra similar de un control normal. Este fenómeno puede incrementarse si la búsqueda de cuerpos de Heinz se hace en muestras de sangre (paciente y control) que han estado por 48 horas a 37 °C. Una diferencia significativa en los valores de metahemoglobina antes y después de esta incubación, constituye un diagnóstico presuntivo.

La estabilidad de la Hb en un hemolizado de eritrocitos que se prepare en fresco a temperaturas variables entre 50 y 70 °C, es mucho menor que la de un control normal. Igualmente, un hemolizado preparado en fresco, que contenga una variable inestable, puede mostrar una mayor precipitación a 37 °C en presencia del tampón de isopropanol, pH 7.4.

Cadenas inestables libres α y β pueden demostrarse en un hemolizado fresco, empleando electroforesis en gel de almidón o de agarosa a un pH alcalino.

Un abordaje analítico general de estas hemoglobino-patías sería:

- a. Electroforesis (solo detecta el 50% de las raras mutantes).
- b. Cuerpos de inclusión (si no está esplenectomizado se incuba 24-48 horas, y luego se tiñe con violeta de metilo (30')).
- c. Prueba de estabilidad (se usa como escrutinio la prueba con isopropanol).
- d. Hemograma: síndrome hemolítico, con frotis anormal (en la fase hemolítica).
- e. Historia clínica: exacerbación de la hemólisis por estrés oxidativo (drogas, inflamación, infección, etc.).
- f. HPLC, isoelectroenfoque, electroforesis capilar.

Métodos de laboratorio para la detección de Hb inestable**Prueba de precipitación de la Hb en alcohol isopropílico (Carrel y Kay)**

Si una solución de Hb se mezcla con un solvente no polar, las fuerzas internas de unión de la molécula de la Hb se debilitan, disminuyendo su estabilidad. De esta manera, en una solución de isopropanol al 17% en tampón Tris-HCl pH 7.4 y a 37 °C, la Hb normal se encontrará a un nivel crítico de estabilidad y comenzará a precipitar después de unos 40 minutos. Si existe una Hb inestable, la precipitación será más acelerada, produciéndose una inestabilidad molecular de la Hb, usualmente evidente dentro de los primeros cinco minutos, y floculación franca cerca de los 20 minutos.

Reactivos**Tampón Tris-HCl 0,1 M, pH 7,4**

Se disuelven 12,1 g de Tris (hidroximetil) aminometano (Trizma base; estándar primario de tris) en 600 ml de agua destilada. Se ajusta el pH a 7.4 con HCl (se requieren alrededor de 88 ml de este). Se lleva a volumen final de un litro con agua destilada.

Solución de trabajo (tampón Tris-HCl-isopropanol)

Se mezclan 17,0 ml de isopropanol con 83 ml del tampón Tris-HCl 0,1 M. Se mantiene en refrigeración y en una botella bien tapada. Debido a que estas determinaciones se realizan ocasionalmente, es preferible preparar la solución de trabajo cuando se vaya a utilizar.

Procedimiento

Se prepara un hemolizado completo con CCl_4 . La concentración de este hemolizado es crítica ($10 \pm \text{g/dl}$). Si la concentración de HbF es mayor a 5%, se usa KCN

en el hemolizado (un volumen de KCN al 2% + cinco volúmenes del hemolizado). En caso de duda, se recomienda utilizar un hemolizado sin solventes orgánicos, ya que se puede dañar la Hb inestable.

Se colocan en baño maría, a 37 °C, dos tubos pequeños (12 X 75 mm) que contengan cada uno 1 ml de tampón de trabajo Tris-isopropanol (tapados para evitar evaporación del alcohol). La temperatura de los dos tubos se equilibra por cinco minutos. Se utiliza uno de los tubos para un control normal y el otro para la muestra en estudio.

Al tubo control se le añade 0,1 ml de un hemolizado fresco normal, con un tiempo similar de toma de muestra al de la incógnita. Al otro tubo se le agrega 0,1 ml del hemolizado del paciente en estudio. Se mezclan por inversión los tubos bien tapados y se lleva el control del tiempo. Se examinan intervalos de cinco minutos con lectura final a los 30 minutos, con el fin de observar floculación o precipitación.

Comentarios

- La solución control con la Hb normal permanecerá clara hasta 30-40 minutos, cuando comienza a precipitar. Si la muestra en estudio tuviese una Hb inestable, la reacción de turbiedad empezará a hacerse evidente dentro de los primeros cinco minutos, con formación de un precipitado floculento dentro de los 20 minutos.
- Esta prueba provee una manera simple y eficaz para identificar la presencia de Hbs inestables. Además, es una prueba excelente de escrutinio para HbH y HbE.
- Si no se usa KCN, altos niveles de Hb fetal pueden dar un precipitado alrededor de los 20 minutos; por esta razón, una prueba positiva debe ser siempre comprobada con la prueba estándar del calor. Esta prueba no da falsos positivos si se cumplen las recomendaciones previas y las que siguen.

Precauciones

- Las variables críticas que deben mantenerse en esta prueba son fundamentalmente dos. La primera, que la solución de isopropanol esté exactamente al 17%, y la segunda, que el control de la temperatura se mantenga inalterable a 37 °C.
- El pH no es crítico, pero no debe bajar de 7.2.
- Debido a que la Hb en solución (hemolizado) se deteriora de manera fácil, se recomienda que los hemolizados de prueba sean recientemente pre-

parados; pueden prepararse solo con H₂O y efectuar de inmediato la determinación. En el caso de la sangre total, esta puede dejarse varios días en refrigeración, sin que se afecte la prueba.

- La presencia de cantidades apreciables de meta-hemoglobina puede dar resultados falsos positivos, ya que esta es considerablemente menos estable que la oxihemoglobina.
- En vista de que la formación de un precipitado floculento es de alguna manera dependiente de la concentración de la Hb, el hemolizado debe poseer una concentración aproximada de 10 g/dl.
- El tipo de anticoagulante utilizado no resulta crítico.
- Si no se posee un control positivo (es decir, una Hb inestable ya caracterizada), se puede preparar un hemolizado de cordón umbilical (HbFA).
- Puede prepararse una solución estándar de control positivo incubando 1 ml de una solución de acetato de Zinc 0,007 M en isopropanol al 17%. La reacción floculante correspondería a una Hb de inestabilidad importante.
- Se debe tener cuidado, además, de que el isopropanol no esté hidratado, porque de esa forma altera el ambiente interno para promover la precipitación.

Prueba de estabilidad al calor (Dacie *et al*)

La Hb normal es escasamente precipitada cuando se calienta a 60 °C por 30 minutos, en tanto que muchas Hbs inestables son desnaturalizadas por completo.

Este procedimiento debe efectuarse en muestras de sangre frescas, y debe siempre correrse al mismo tiempo un control normal. Si la muestra del paciente en estudio no es fresca, deberá usarse un control que posea la misma edad de la incógnita.

Reactivos

Tampón de Tris-HCL, pH 7.4

Tris (hidroximetil) aminometano	18,17 g
HCl 1N	42 ml
H ₂ O dest. c.s.p.	1 litro

Método

Un mililitro de células rojas lavadas se lisa con 5 ml de H₂O y luego se añaden 5 ml del tampón Tris-HCl. El estroma se elimina por centrifugación (700 g por

15 minutos). 5 ml de lisado se transfieren a un tubo, el cual se coloca luego a 50 °C por 60 minutos. El tubo debe ser examinado periódicamente, a fin de detectar turbiedad o un fino precipitado.

Comentarios

- Un precipitado fácilmente visible será evidente si existiera una Hb inestable. Una ligera precipitación o turbiedad es de dudosa significación; en todo caso, la prueba deberá repetirse si ello sucediera.

De cualquier forma, los resultados con la muestra del paciente deben ser cuidadosamente comprobados con los del control normal. Si se presenta un precipitado, la suspensión será centrifugada y se tomarán volúmenes iguales tanto del supernadante claro como del hemolizado original (no calentado); estos serán diluidos 1:20 en reactivo modificado de Drabkin (Van Kampen y Zijlstra), y las respectivas soluciones se leerán a 280 nm contra un blanco de Drabkin.

$$\% \text{ de Hb inestable} = \frac{A_{280 \text{ nm}} \text{ muestra calentada}}{A_{280 \text{ nm}} \text{ muestra no calentada}} \times 100$$

- Menos del 5% de la Hb normal precipita a 50 °C. Debe ponerse atención al color del precipitado. Un precipitado blanco se encuentra cuando la Hb se debe a una mutación en la bolsa del heme, lo cual da como resultado la pérdida del heme de la cadena proteica. Un precipitado café-rojizo se forma cuando las cadenas α y β se disocian de manera más fácil de lo normal, con una unión normal del heme a la globina.
- Como en toda prueba de bioquímica hematológica, debe correrse una muestra de sangre normal bajo las mismas condiciones. El diagnóstico de una Hb inestable se confirma por otras pruebas, incluyendo afinidad por el oxígeno, estudios funcionales, morfología eritrocítica, patrón electroforético de la Hb y la prueba de precipitación en alcohol isopropílico.

tudios especializados en la investigación de pacientes con hemoglobinopatías.

Específicamente, la tinción supravital con violeta de metilo se utiliza para demostrar la presencia de cuerpos de inclusión en pacientes esplenectomizados con Hbs inestables, así como para la demostración de precipitados de cadenas α en casos homocigotos de β talasemia.

La tinción con azul cresil brillante, por su parte, se recomienda para la detección de cuerpos de inclusión en eritrocitos de pacientes no esplenectomizados, ya que favorece condiciones que aumentan la precipitación de la Hb inestable. Esta solución también se recomienda para teñir inclusiones por HbH, lo cual se realiza a 37 °C.

Tinción de cuerpos de inclusión

En la enfermedad por Hbs inestables, en la α talasemia (rasgo o gene α^0 y enfermedad por HbH) y en la β talasemia homocigótica, se forman precipitaciones intracelulares de Hb o de globina en los eritrocitos y/o precursores nucleados. De igual forma, los pacientes deficientes de G6PD pueden presentar cuerpos de inclusión. En las Hbs inestables estos precipitados están compuestos de moléculas de la mutante lábil, mientras que en las talasemias su composición es a base de un exceso de cadenas α o β .

Bajo condiciones apropiadas, los precipitados pueden visualizarse fácilmente como cuerpos de inclusión intracelulares o cuerpos de Heinz. En vista de que los procedimientos de tinción para estos efectos son simples y de que los hallazgos morfológicos son característicos, las pruebas para cuerpos de inclusión son muy útiles en el diagnóstico; por eso, deben usarse junto con los análisis hematológicos de rutina y los es-

Materiales y métodos

Siempre se debe usar sangre fresca anticoagulada. Las mejores tinciones se logran con sangre anticoagulada con EDTA o ACD. Una cantidad excesiva de EDTA o heparina suele originar tinciones pobres. La solución de ACD es la más indicada para muestras de médula ósea.

Reactivos

Se prepara una solución de azul cresil brillante al 1% en NaCl al 0,9% (similar a la que se utiliza para teñir reticulocitos). También se puede usar la tinción con violeta de metilo al 1% del colorante en solución salina fisiológica. Estas dos soluciones deben ser filtradas antes de su utilización. Se recomienda preparar pequeños volúmenes de ambas soluciones, en vista de que la eficiencia tintorial disminuye en las soluciones viejas. Esto es particularmente cierto para la solución de violeta de metilo.

Técnicas

El colorante azul cresil se puede usar para teñir tanto cuerpos de Heinz preformados como inducidos. Se mezcla bien una parte de la solución y dos partes de sangre y se incuban a temperatura ambiente (para cuerpos preformados) o a 37 °C (para cuerpos inducidos). A intervalos de 20 minutos, una hora y dos horas se practican frotis sanguíneos, los cuales se observan luego a inmersión.

La solución de violeta de metilo se usa para la identificación de cuerpos de Heinz preformados. En este caso, se mezclan e incuban a temperatura ambiente partes iguales del reactivo y de la sangre, o dos partes del reactivo y una de médula ósea. A intervalos de 30 minutos, una y dos horas se practican frotis. Los cuerpos de Heinz preformados también pueden observarse en preparaciones húmedas entre porta y cubreobjetos.

Interpretación

La muestra tomada a los 20 minutos (o a la hora) es control del número de reticulocitos presentes y es importante para saber que la tinción funciona. Si hay un aumento en las reacciones tintoriales de las preparaciones (especialmente a la hora y a las dos horas), es muy probable que se deba a la precipitación de una Hb desnaturalizada. En este último caso, el patrón es muy diferente del retículo teñido que muestran los reticulocitos, pues se presenta difuso en toda la célula.

Cuando se trata de alfa talasemia por HbH, los cuerpos de inclusión tienen el aspecto como el de una bola de golf (HbH), y el color del precipitado es azul pálido, diferente del de los reticulocitos, que es azul negruzco y en forma de red.

En los pacientes con α talasemia menor tipo gen severo α^0 , solo unas pocas células (1:100 a 1:10.000) contienen cuerpos de inclusión de HbH, y en la condición α^+ es prácticamente imposible observar estas alteraciones.

En la β talasemia mayor, los cuerpos de inclusión son también esféricos y se visualizan tanto en los eritrocitos como en los eritroblastos. Estas inclusiones se observan con el microscopio de contraste de fases en preparaciones húmedas no teñidas, aunque también se tiñen óptimamente con violeta de metilo.

En cuanto a las inclusiones preformadas (en pacientes esplenectomizados), estas aparecen como inclusiones grandes esféricas, únicas o múltiples (tanto para HbH como para otras Hbs inestables), similares a un cuerpo de Howell Jolly.

Entre un 10% y un 100% de los eritrocitos de un paciente con HbH pueden contener múltiples cuerpos de inclusión de color verde azulado. Estas condiciones se distinguen fácilmente del material reticular azul de los reticulocitos.

En pacientes esplenectomizados (o en quienes tiñen gran número de eritroblastos circulantes), tanto la sangre periférica como los aspirados de médula ósea son adecuados para esta prueba. Considerando que el tiempo óptimo de tinción de las muestras de médula ósea depende de la celularidad de la muestra, los frotis con este material se deben preparar y examinar cada 30 minutos durante dos horas. La eficiencia de la tinción se determinará por el color del núcleo de los eritroblastos.

En casos positivos, el examen de médula ósea revela inclusiones grandes e irregulares de cadenas α precipitadas, las cuales, por lo general, son únicas y están íntimamente adheridas al núcleo de los eritroblastos ortocromáticos.

Cabe destacar que la proporción de células nucleadas con inclusiones varía, pero por lo general excede el 50% de la población de eritroblastos ortocromáticos.

Por último, es importante mencionar que la prueba para cuerpos de inclusión es más sensible que la electroforesis para demostrar la presencia de HbH.

BIBLIOGRAFÍA

Brosious EM, Morrison BY, Schmidt RM. Effect of hemoglobin F leves, KCN, and storage on isopropanol precipitation test for unstable hemoglobins. *Am J Clin Pathol* 1976; 66(5): 878-882.

Carrell RW, Kay RA. A simple method for the detection of unstable haemoglobins. *Brith J Haemat* 1972; 23(5): 615-619.

Dacie JV, Lewis SM. *Practical hematology*. 5 ed. London: Churchill Livingstone; 1975.

Dacie JV, Grimes AJ, Meisler A, Steingold L, Hemsted EH, Beaven GH, *et al*. Hereditary Heinz body anaemia. A report of studies on five patients with mild anaemia. *Brith J Haematol* 1969; 10: 388-402.

Efremov GD, Husman TH. The laboratory diagnosis of hemaglobinopathies. En: Rosenberg SA (editor). *Clinics in hematology*. Philadelphia; Saunders; 1974.

Lehmann H, Hunstman RG. *Man's Haemoglobins: including the haemoglobinopathies and their investigation*. 11 ed. Amsterdam: North Holland Publishing Company; 1974.

Papayannopoulou R, Stamatayannopoulous G. Stains for inclusion bodies. En: Standardization of laboratory reagents and methods for the detection of hemoglobinopathies. Atlanta: Center for Disease Control; 1974.

Schmidt RM. Hematology procedure manual. Atlanta: Center for Diseases Control; 1978.

Schmit RM, Moo-Penn WF, Brosious EM. Advanced laboratory methods of hemoglobinopathy detection. Atlanta: Center for Diseases Control; 1974.

Sáenz GF, Moreira J. Laboratorio de hemoglobinopatías. Manual latinoamericano. Costa Rica: Ministerio de Salud; 1980.

Sáenz GF (editor). Hematología analítica. 5 ed. Costa Rica: EDNASSS; 2008.

Schmidt RM, Brosious EM. Basic laboratory methods of hemoglobinopathy detection. 6 ed. Atlanta: Center for Diseases Control; 1976.

ANÁLISIS BIOQUÍMICO DE LAS TALASEMIAS: CUANTIFICACIÓN DE HEMOGLOBINA A₂ Y HEMOGLOBINA FETAL

Dr. German F. Sáenz Renauld
Dr. Walter E. Rodríguez Romero

INTRODUCCIÓN

La cuantificación de fracciones de la hemoglobina (Hb), fundamentalmente la A₂ y la fetal, son indispensables para el diagnóstico bioquímico de certeza de la β y $\delta\beta$ talasemia, ya que son los parámetros que se elevan al existir un desbalance en la síntesis de las cadenas de globina β . Ambas se pueden cuantificar en forma directa por medio de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y otros métodos como electroforesis capilar; sin embargo, en este capítulo solo se detallan los métodos tradicionales.

La HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$) permite identificar la β tal menor, cuando se encuentra incrementada; mientras que la HbF elevada indica una $\delta\beta$ talasemia o una persistencia hereditaria de la Hb fetal (PHHbF). En el caso de la HbF, esta se puede incrementar también en drepanocitosis y en anemias hemolíticas crónicas y lógicamente en la elevación fisiológica del recién nacido.

CUANTIFICACIÓN DE LA HbA₂ POR ELECTROFORESIS-ELUCIÓN (Marengo-Rowe, modificado por Alperin)

Principio

Cuando se coloca una solución de Hb en un soporte de acetato de celulosa, ella migra de acuerdo con su carga eléctrica. En ese soporte, la HbA₂ se separa de las demás fracciones excepto de las HbC y E, entre otras.

Reactivos

Tampón de trabajo de Tris-EDTA-borato (TEB) pH 8.4, idéntico al utilizado en el método de la electroforesis en acetato de celulosa (Schneider, ligeramente modificado por la Cátedra de Hematología, Facultad de Microbiología, UCR). Pueden emplearse cintas usadas sin soporte plástico (tipo Sepharose III, Gelman) o con soporte (tipo Titan III, Helena).

Método

- Se dejan las cintas o placas de acetato de celulosa en solución tampón durante 20 minutos.
- Se seca entre dos hojas de papel de filtro para eliminar el exceso de tampón.
- Se colocan las cintas o placas en la cámara, cuyos compartimientos fueron llenados de previo con la solución tampón de TEB.
- En cada cinta se aplican 4 μ l de una solución de Hb con una concentración aproximada de 10 g/dl.
- Se realiza la corrida durante 40 minutos, con una diferencia de potencial de 400 voltios.
- Después de la corrida, se sacan las cintas de la cámara y con tijeras se cortan las zonas con HbA, Hb lentas y rápidas (y cualquier otra Hb que estuviese presente), así como la de la HbA₂. Ayudándose con el uso de unas pinzas, en tubos separados, utilizar 2 ml de agua destilada para la fracción de la HbA₂ y 10 ml para la HbA (y cualquier otra fracción).
- A cada fracción de oxihemoglobina así disuelta, se lee la absorbancia a 415 nm contra un blanco de agua.

Cálculos

$$\% \text{ de HbA}_2 = \frac{A \text{ de HbA}_2}{(A \text{ HbA} \times 5) + \text{Absorbancia HbA}_2} \times 100$$

Notas en torno a las fases de elución y cuantificación

- Las cintas se remueven de la cámara utilizando pinzas, con cuidado de que no caiga tampón sobre la muestra.

- Se cortan y eliminan los extremos que estaban sumergidos en el tampón (± 3 cm).
- El componente A (libre de A₂) se corta a la mitad del paso entre la HbA y la HbA₂, eliminando ambos extremos de la cinta. Se coloca la fracción A en 10 ml de H₂O y la fracción A₂ en 2 ml de H₂O.

- Se lavan con H₂O en cada corte las tijeras utilizadas y se secan bien. Las muestras se dejan eluir durante 30 minutos a 25 °C, agitando ocasionalmente para que la Hb se eluya por completo. Los tubos con las fracciones hemoglobínicas pueden dejarse hasta 12 horas a 4 °C. Debe tenerse el cuidado de taparlos adecuadamente.
- Se leen los eluidos a 415 nm, contra blanco de H₂O.
- Puede substituirse el H₂O como eluente por una solución de EDTA tetrasódico al 0,3%; con esto se elimina cualquier empaldecimiento de los eluidos de oxiHb, por efecto del cobre del agua.
- Las pinzas y las tijeras deben estar limpias, y deben ser utilizadas de manera exclusiva para estas determinaciones.

Valores

- Rangos normales (con el método) = 2,5-3,80% de HbA₂.
- Valores en beta-talasemia menor = promedio: 5,15; rango = 3,8-8,2%.
- PHHbF tipo negro = promedio: 1,37; rango = 1,0-2,3%.
- Anemia megaloblástica = promedio: 3,78; rango = 3,0-5,2%.
- Anemia por deficiencia de hierro = promedio: 2,21; rango = 1,70-2,70%.
- Delta-beta tal menor (F-tal) = 1,70-2,70%.
- Anemia sideroblástica = promedio: 2,5% rango = 1,5-3,0%.
- Hemoglobinas inestables de cadenas beta = promedio: 4,0%; rango 4,2-5,2%.
- Enfermedad por HbH (a⁰/a⁺) = < de 2%.
- En beta-tal, con deficiencia de Fe o de folatos disminuyen los valores esperables de la HbA₂.

MÉTODO MICROCROMATOGRÁFICO PARA HbA₂ (Método de Efremov et al, ligeramente modificado por Cátedra de Hematología, Facultad de Microbiología, UCR)

Principio

La cromatografía de intercambio iónico se basa en las características eléctricas de las distintas Hbs, que están a la vez en función de la carga eléctrica respectiva de cada cadena globulínica constituyente. Con ciertos sistemas tampón, la interacción de grupos cargados de resina de intercambio iónico (en el caso de la DEAE-celulosa) y de intercambio aniónico, con los grupos cargados de las moléculas de Hb, permite la separación de las diferentes fracciones hemoglobínicas. Un determinado tipo de Hb queda absorbido a las partículas de la resina y solo se desprende de estas cuando es eluida mediante un adecuado sistema de tampones.

En el micrométodo con DE-52 celulosa, una vez equilibrada la microcolumna (columna de resina de 5 cm en pipeta Pasteur de 0,5 cm de diámetro interno) a pH 8.5 y cargada con la solución de Hb a estudiar, la fracción A₂ se eluye fácilmente al ser menos electronegativa que la HbA, gracias al uso de un tampón desarrollador de Tris HCl de pH crítico 8.25, que contiene 100 mg de KCN por litro de tampón. A partir de una alícuota del mismo hemolizado diluido (o de trabajo) que se utilizó para cromatografiar, se prepara un patrón de referencia de 100% de Hb. Con las absorbancias del eluido y del patrón, se logra obtener la proporción porcentual de la HbA₂.

Cabe destacar que existen también columnas ya preparadas comercialmente.

Reactivos

Tampón madre 1.0 M de Tris (hidroximetil) aminometano

Tris (estándar primario)	121,10 g
H ₂ O c.s.p.	1 L

Tampones de trabajo 0.05 M Tris-HCl, pH 8.5, 8.25 y 7.0 (0.25)

Tampón madre (1.0 M)	100 ml
KCN	200 mg
HCl concentrado, en volumen necesario para ajustar los pH a 8.5, 8.25 y 7.0, respectivamente.	
H ₂ O destilada c.s.p.	2 L

DEAE celulosa: dietil aminoetil – celulosa, intercambio aniónico

DEAE prehinchada	500 g
Tris-HCl, 0,05 M, pH 8.5, en volumen de 2 L necesarios para equilibrar la resina (500 g).	

Preparación de la resina y de las columnas

La DE-52 celulosa de Wathman o la DEAE de Sigma, microgranular y prehinchada, se equilibra a temperatura ambiente mediante lavados repetidos con tampón 0,05 M de Tris-HCl, pH 8.5, que contenga 100 mg de KCN por litro. Este es el paso crítico.

El equilibrio se logra mezclando en un agitador magnético, durante 30 minutos, una parte de la resina con tres partes del tampón. Luego de la sedimentación (30 minutos), el sobrenadante y las partículas finas suspendidas se remueven; el proceso de equilibrio se realiza por lo menos tres veces más hasta que el pH de la mezcla sea de 8.5. En caso de que se requiera, puede dejarse agitando también por más tiempo y pueden necesitarse más lavados adicionales. Una vez que se ha alcanzado el pH de 8.5, se deja la resina en una suspensión final al 50% en el tampón y se coloca en un recipiente hermético.

Se preparan unas pipetas Pasteur a las que se les coloca una diminuta base de algodón (o de algodón de vidrio) en la parte estrecha y se humedece el interior de la pipeta y el tapón del algodón con el tampón de pH 8.5. Se preparan columnas de 5 cm o de 7.0 cm, según sea el caso, aspirando la mezcla de resina con otra pipeta Pasteur. Posteriormente, se elimina con la misma pipeta el exceso de tampón que se encuentra en la parte superior de las columnas así formadas. Cuando se va a colocar el hemolizado, no debe quedar tampón en la parte superior de la resina. Para cuantificar A_2 en ausencia de HbS, es suficiente una columna de 5 cm.

Preparación y aplicación del hemolizado

Se prepara el hemolizado de acuerdo con el método original, en el que una gota de la solución de Hb (8-10 g/dl) se diluye con seis de agua destilada o del tampón pH 8.5 y una gota de KCN al 2%. Luego, se sugiere realizar el siguiente procedimiento: de un hemolizado de 8-10 g/dl de Hb se toman 50 μ l y se mezclan con 200 μ l del tampón pH 8.5 (hemolizado de trabajo). Se aplican 100 μ l en la parte superior de la columna y se deja que la solución de Hb se absorba por completo (tres a cinco minutos).

Para realizar el hemolizado también puede usarse sangre total o un pequeño volumen de células rojas

concentradas (0,04 ml de células empacadas más ocho gotas de agua y una gota de KCN al 2%), o una muestra de sangre recogida en papel de filtro Wathman N° 2 o N° 3 MM; en este caso, se corta la mancha de sangre dejada por una gota que ha caído espontáneamente al papel y se sumerge por 15 minutos en 0,5 ml de reactivo hemolizante (100 mg de EDTA/dl y un ml de KCN). En la mayoría de los casos, se obtendrá una solución de 3-6 mg de Hb, la cual debe ser aplicada en su totalidad a la columna.

Proceso microcromatográfico

Se adapta a la pipeta Pasteur un pequeño embudo, intercalando un tubo corto de hule o de plástico. De esta suerte, los reveladores o tampones se mantienen en un flujo continuo de 20 a 40 ml por hora. A través del embudo y el tubo de hule, se añade lentamente a la columna el tampón de pH 8.25, con la ayuda de una jeringa; a esta se le adapta una espiga larga de metal de unas cuatro pulgadas, tratando de que el desarrollo no provoque resuspensión de la resina y del hemolizado ya embebido. En el embudo se deja un volumen aproximado de 10 ml del tampón y se deja eluir hasta que se observe una separación aproximada de 1-2 cm entre la HbA₂ y la HbA que permanece en el punto de aplicación. Entonces, se coloca un balón aforado de 10 ml y se inicia la recolección de la fracción eluida. Una vez que se completa la elución, se puede aforar con el tampón de 8.25. La absorbancia de la fracción (A_2) se lee a 415 nm contra un blanco del tampón.

Preparación del patrón 100%

Se mezclan 50 μ l de la solución de Hb (hemolizado de trabajo) con 5 ml de tampón Tris-HCl, pH 8.25 o H₂O destilada. La absorbancia se obtiene contra un blanco del mismo tampón.

$$\% \text{ de HbA}_2 = \frac{D.A.A_2}{D.O. \text{ Patrón}} \times 100$$

Valores normales

- HbA₂ = 2,9-3,8%
- β -talasemia menor = 3,8-8,0%

Debe siempre correrse un control normal y un control elevado; los análisis por duplicado de cada incógnita son innecesarios, si los dos controles mencionados caen dentro de los límites apropiados.

Precauciones en la microcromatografía para HbA₂

- Debe usarse el tipo correcto de electrodo para la lectura del pH de los tampones de Tris.
- Para preparar dos litros de tampón, se añade solución madre de Tris 1,0, KCN y H₂O destilada hasta aproximadamente 800 ml; entonces se ajusta el pH con HCl y luego se lleva a volumen de dos litros.
- Cuando se empaca la DE-52 en la columna, se debe evitar la formación de burbujas; con ese fin se puede humedecer el tampón de algodón y la columna con el tampón. Una solución muy delgada de la suspensión o pasta de la resina también facilita el empaquetamiento.
- Para evaluar la precisión del espectrofotómetro a 415 nm, se aplican 3-5 mg de Hb a la columna. Si la D.O. lee 0,500 y 1,500, se tendrá la seguridad de trabajar en un ambiente de lectura adecuado, ya que la precisión de algunos espectrofotómetros se halla disminuida a 415 nm, cuando la D.O. de la solución de Hb es menor de 0,25 o mayor de 2,50. Por ello es que la concentración óptima de Hb al aplicarse a la columna debe ser entre 3 y 5 mg (micrométodos).
- Después de que la HbA₂ ha sido visiblemente eluida de la columna, se deja fluir más tampón pH 8.25, para remover toda la fracción que puede ser invisible al ojo, como la que se encuentra detrás de la banda mayor de la HbA₂.
- La resina y los tampones se guardan a temperatura ambiente.
- El ajuste del pH del tampón 8.25 debe hacerse en forma exacta. Si la banda del hemolizado se mueve más allá de un centímetro al añadir el tampón de pH 8.25, es porque seguramente el pH está más bajo (por ejemplo, 8.15-8.20) o porque el pH de la resina también lo está (por ejemplo, 8.30-8.40). Si ello sucede, todo debe ajustarse a lo estipulado en el método.
- Siempre se debe confirmar el pH del tampón y el de la resina de depósito cuando se prepara la columna y para la elución.
- Se debe descartar cuando se observen contaminados con hongos o si se demuestra mucha alteración del pH (por ejemplo, $\pm 0,3$ unidades).
- Con este procedimiento las Hbs C y E no se separan de la HbA₂.

Regeneración de las columnas

Con el objetivo de hacer más económico el procedimiento microcromatográfico, las columnas usadas se pueden regenerar lavándolas con un volumen de aproximado de 20 ml del tampón Tris-HCl pH 7.0. Cuando las columnas estén limpia del todo, se lavan con unos seis volúmenes de 7 ml del tampón pH 8.5; el pH del efluente se lee hasta que sea el óptimo. En estas circunstancias, las columnas se pueden reutilizar hasta cinco veces sin que se alteren los resultados.

MICROCROMATOGRAFÍA PARA HbA₂ Y HbS EN DE-52 CELULOSA

(Micrométodo de Efremov et al, modificado)

Procedimiento

Se utiliza el mismo procedimiento antes mencionado, con la diferencia de que el empaquetamiento de las pipetas Pasteur con la DE-52 celulosa, debe realizarse a unos 7-7,5 cm. Esta modificación es necesaria, en vista de que la HbS se eluye entre la HbA₂ y la HbA, por lo que se requiere de una columna más larga que permita la separación.

La modificación básica al método original consiste no solo en utilizar microcolumnas de 7,5 cm en vez de las de 15 cm, sino también en no revelar por elución ni la S ni la remanente.

Se aplican 100 μ l del hemolizado de trabajo, preparado al igual que el método precitado, y se empieza la colecta de la zona de la A₂ (con tampón pH 8.35) cuando dicha fracción se encuentra en el tercio inferior de la columna, con ajuste final a 10 ml. Se obtiene el valor porcentual de la HbA₂ con la preparación de un patrón (P) de Hb de 100%, en idénticas condiciones al micrométodo previamente citado. Los cálculos serían:

$$\% \text{HbA}_2 = \frac{\text{D.O. A}_2}{\text{D.O. Patrón}} \times 100$$

Para cuantificar HbS (AS o SS)

- Luego de eluir la HbA₂, se revela la HbS con un tampón de pH 8.20 y se colecta el eluido en un frasco volumétrico de 10 ml.
- Luego se eluye la Hb remanente (R) con el tampón de pH 7.00 (en caso de que se quiera recuperar la resina).

$$\% \text{HbS} = \frac{\text{D.O. HbS}}{\text{D.O. Patrón}} \times 100$$

Valores de HbA₂ y de HbS por microcromatografía de hemolizado AS

- AS = 35-45%.
- AS + α^0 tal = < de 28%.
- AS + α^+ tal = 28-35%.
- HbA₂ = similares a los antes mencionados (2,8 - 3,8%).

CUANTIFICACIÓN DE LA Hb FETAL (HbF)

La Hb fetal (HbF) es la hemoglobina principal en el feto desde el cuarto mes del embarazo hasta los seis meses de edad. Esta se encuentra formada por dos cadenas α y dos cadenas γ . El aminoácido 136 de la cadena γ puede ser una alanina o una glicina, lo que da origen a dos tipos distintos de cadenas γ : la A γ y la G γ , respectivamente. Se ha demostrado que puede

existir un tercer tipo de cadena γ , denominada T γ , en la que una isoleucina en posición 75 ha sido sustituida por una treonina.

La correcta cuantificación de la HbA₂ y de la HbF es un requerimiento básico en el estudio de los síndromes talasémicos. De ahí que la precisión y la exactitud en la determinación de la HbF constituyen dos aspectos esenciales en el diagnóstico de las b-talasemias homocigotas y de las $\delta\beta$ -talasemias, en el pesquizado de la persistencia hereditaria de la Hb fetal (PHHbF) y en la correcta caracterización de la anemia drepanocítica.

Existe un gran número de enfermedades y situaciones clínicas, unas congénitas y otras adquiridas, donde se pueden observar tasas elevadas de HbF, tal como se muestra en el Cuadro N° 1.

Cuadro N° 1. Enfermedades y situaciones clínicas en las que puede observarse un incremento en los niveles de la HbF	
Trastornos genéticos en la producción de Hb	
- $\delta\beta$-talasemias (F-tal). - Persistencia hereditaria de Hb fetal (homogénea y heterogénea). - β-talasemias con variantes estructurales de la cadena beta. - Variantes estructurales de cadenas beta de la Hb. - Hb Lepore. - b-talasemias (tipo A2 y F, heterocigota u homocigota - Enfermedad de Cooley).	
Trastornos no hereditarios	
- Aplasia medular. - Anemias megaloblásticas. - Anemias sideroblásticas (SMD). - Hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN). - Anemias hemolíticas. - Embarazo. - Hipertiroidismo. - Eritroblastopenia congénita (Diamond Blackfan). - Leucemias agudas. - Leucemias crónicas (en especial la leucemia mielocítica crónica -LMC- juvenil). - Mielofibrosis. - Policitemia vera y otros síndromes similares. - Tumores epiteliales.	

DETERMINACIÓN DE LA HbF SEGÚN BETKE ET AL

La Hb fetal posee la propiedad de presentar una mayor resistencia a su desnaturalización en un medio alcali-

no, no así las restantes Hbs, que pueden ser desnaturalizadas por álcalis y luego precipitadas en una solución saturada de sulfato amónico. La HbF -en estas condiciones- permanece en solución y su porcentaje puede ser medido espectrofotométricamente.

Reactivos*Solución de Drabkin*

Carbono monosódico (CH_3HNa)	1 g
Ferricianuro potasio $((\text{CN})_6 \text{Fe}) \text{K}_3$	198 mg
Cianuro potasio (CNK)	52 mg
Agua destilada c.s.p.	1.000 ml
Conservar a temperatura ambiente en recipiente de vidrio oscuro.	

Solución de hidróxido sódico 1,28 N

Hidróxido sódico (NaOH)	1,28 g
Agua destilada c.s.p.	25 ml
Conservar a 4 °C por no más de una semana.	

Solución saturada de sulfato amónico

Sulfato amónico $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	700 g
Agua destilada c.s.p.	1.000 ml
Disolver el sulfato amónico a 70-80 °C; después filtrar la solución y conservar a temperatura ambiente.	

Muestra

Preparar un hemolizado, como se indica en el capítulo 49. Posteriormente, ajustar la Hb de este a una concentración de 5 a 8 g/dl.

Procedimiento

1. Mezclar en un tubo 0,5 ml de hemolizado con 10 ml de reactivo de Drabkin. Pipetear en tres tubos distintos (uno para el control y dos para el problema) 3 ml de la mezcla anterior.
2. Añadir a cada tubo problema 0,2 ml de solución de NaOH, mezclar bien y dejar actuar durante DOS MINUTOS EXACTOS.
3. Al cabo de ese tiempo, añadir 2 ml de solución saturada de sulfato amónico a ambos tubos problema y mezclar varias veces por inversión, dejándolos en reposo durante 5-10 minutos.
4. Añadir al tubo control 0,2 ml de agua destilada y 2 ml de solución saturada de sulfato amónico. Mezclar bien y dejar en reposo 5-10 minutos.
5. A continuación, filtrar el contenido de los tubos problema y control a través de un papel Wathman N° 1 o 2.
6. Diluir 1 ml de filtrado control con 4 ml de agua destilada.

7. Determinar la densidad óptica (D.O.) de los tres tubos a 540 mn.

$\% \text{HbF} = \frac{\text{D.O. HbF}}{\text{D.O. control} \times 5} \times 100$

Valores de referencia = < del 1% (Betke)

El Comité Internacional de Estandarización en Hematología (ICSH) recomienda el método de Betke *et al*, con el cual se obtienen valores aceptables para niveles de HbF que oscilen entre un 2% y un 40%, mientras que se subestiman los valores superiores. Considerando esto, el ICSH aconseja que para niveles superiores al 40% se utilice la cromatografía, y que para cifras inferiores al 2% se emplee el radioinmunoensayo.

De forma característica, la HbF está muy elevada en la β -talasemia homocigota, en la $\delta\beta$ talasemia homocigota, en la Hb Lepore homocigota, en la condición doble heterocigota de β -talasemia y en variantes estructurales de la cadena β , así como en la persistencia hereditaria de la HbF.

Del mismo modo, dentro de los síndromes talasémicos, existe un aumento de la HbF, aunque ya no tan

llamativo, en las formas heterocigotas de $\delta\beta$ -talasemia, Hb Lepore, variantes estructurales de las Hbs S o C y β -talasemia.

En otros cuadros no talasémicos pueden encontrarse también elevaciones moderadas de las cifras de HbF; entre ellos, la aplasia medular congénita o adquirida, las anemias megaloblásticas no tratadas, las anemias refractarias (SMD) y, en general, todos aquellos procesos acompañados de estrés hematopoyético (anemias hemolíticas y HPN, principalmente). En las leucemias y síndromes mieloproliferativos pueden detectarse cifras altas de HbF, en especial en la leucemia mielomonocítica juvenil.

En el Cuadro N° 2 se detallan los cambios en los niveles de la HbF luego del nacimiento.

Cuadro N° 2. Valores de la Hb Fetal luego del nacimiento	
Edad	Valores normales de HbF
Nacimiento	79-90
1 mes	50-75
2 meses	25-60
3 meses	10-35
4 meses	5-20
6 meses	8
9 meses	5
1 año	2
adulto	1

DETERMINACIÓN DE HbF POR EL MÉTODO DE DESNATURALIZACIÓN ALCALINA DE LA OXIHEMOGLOBINA (SINGER *ET AL*)

Principio

La Hb fetal no se desnatura cuando se incuba con NaOH 1/12 N durante un minuto a temperatura ambiente. Las Hbs que se desnaturalizan con la solución alcalina (A, S, C, etc.) precipitan al agregarles la solución de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ acidificada (50% de saturación), debido a que esta baja el pH del medio. La solución remanente contiene la hemoglobina fetal presente en la sangre. Este método es el clásico para medir HbF, siendo de buena utilidad clínica.

Reactivo y equipo

- Hidróxido de sodio 1/12 N, pH 12.7. Guardar a 5 °C en una botella de polietileno.
- Sulfato de amonio 50% de saturación; disolver 400 g de sulfato de amonio en un litro de agua destilada. Añadir ácido clorhídrico concentrado hasta lograr

un pH de 3.6 (alrededor de 2,5 ml).

- Cronómetro.
- Tubo de ensayo de 16 x 100 ml.
- Embudos.
- Papel filtro Whatman N° 42-44 o SN° 598, de 7 a 11 cm de diámetro o similar para filtrado cuantitativo.

Técnica

- Se realiza un hemolizado completo con una concentración de hemoglobina entre 9 y 11 g/dl.
- Se pipetea 1,6 ml de NaOH 1/12 N en un tubo de ensayo 16 x 100 mm. Se deja que la solución de NaOH tome la temperatura ambiente antes de hacer las mediciones.
- Se pipetea 0,1 ml del hemolizado en el tubo de prueba; la pipeta se lava seis veces en la mezcla; se mezcla por inversión en vortex y cuando el hemolizado es expedido en el tubo, se pone de inmediato en marcha el cronómetro.
- Al minuto exacto, se interrumpe la reacción y se añaden al tubo rápidamente 3,4 ml de la solución de sulfato de amonio, mezclando el contenido seis veces por inversión.
- Se filtra de inmediato. El filtrado variará de rosado a rojo según los niveles de hemoglobina fetal.
- La densidad óptica del filtrado de la muestra en prueba (D_1) se determina a 540 nm, contra un blanco de reactivos constituido por 1,6 ml del hidróxido de sodio 1/12 N y 3,4 ml del reactivo precipitante.

En igual forma se leerá la densidad óptica del patrón de hemolizado 100% (D_2), el cual se prepara añadiendo 0,02 ml del hemolizado original a los reactivos premezclados en la misma proporción antes señalada, y se lee sin filtrar.

El porcentaje de la hemoglobina álcali-resistente (HbF) se calcula de la siguiente manera:

$$\% \text{ HbF} = \frac{D_1}{D_2} \times 0,203 \times 100$$

(0,203 es el producto de las diferencias de dilución entre el tubo D2 y D1; es decir 1:51 y 1:251, respectivamente = $51/251 = 0,203$).

Comentarios

- La HbA y todas las otras Hbs (excepto la Rainier y la Bart) precipitan con el NaOH. Cualquier coloración en el filtrado es para la HbF (o la Rainier y la Bart).
- El procedimiento debe seguirse con exactitud. El intervalo de tiempo, temperatura, pH y la concen-

tración de los reactivos son críticos.

- El valor de la desnaturalización al minuto representa el grado de Hb fetal que queda después de la reacción con el álcali (un minuto). Sin embargo, una pequeña cantidad de HbF se destruye durante este intervalo. Para corregir esta destrucción, el valor obtenido se multiplica por 1,04 para obtener el valor al tiempo cero.
- Puesto que la metahemoglobina fetal es desnaturizada por el álcali, la muestra debe procesarse con hemolizado fresco o de no más de una semana de preparado (con el aditivo de KCN).
- Los resultados con valores de Hb resistente al álcali de 3% o menores, son de poca significación, ya que en muestras de sangre normalmente puede encontrarse una pequeña cantidad de HbF. Por otro lado, los valores por encima del 3% pueden considerarse como indicativos de presencia importante de HbF.

CAUSAS DE ERROR EN LA DETERMINACIÓN DE HbF

Las principales causas de error en la determinación de la HbF derivan de la falta de atención a alguno de los siguientes apartados:

- El hemolizado debe realizarse cuidadosamente, con los niveles de la Hb en los límites aconsejados.
- El reactivo alcalino debe ser preparado de nuevo cada semana. Periodos superiores determinan alteraciones en el pH que son origen de falsos aumentos de la HbF.
- El tiempo de exposición al reactivo alcalino debe ser exacto. En este lapso se produce la desnaturalización de toda la Hb no fetal presente; solo una mínima parte de la HiCN fetal se desnaturaliza. Tiempos superiores a los dos minutos pueden ocasionar falsos resultados.
- La temperatura se debe mantener constante (20 °C) durante el tiempo de exposición al reactivo alcalino.
- La aparición de filtrados poco claros debe obligar a una nueva filtración; para ello se utilizan los mismos filtros de Whatman.
- En aquellos casos en que se detecten niveles elevados de HbF, es necesario una dilución del hemolizado hasta valores entre el 5% y el 10%, que son con los que se consigue el grado de precisión más aceptable.

TÉCNICA DE ELUCIÓN ÁCIDA PARA HB FETAL ERITROCITARIA (NIERHAUS Y BETKE)

Principio

El método se basa en la diferencia que existe en el

índice de disociación de las subunidades entre la HbA y la HbF. A valores bajos de pH la HbA y sus variantes adultas son solubles; por lo tanto, se eluyen de las células, pero la Hb fetal permanece precipitada en el interior de los eritrocitos y por ende, no se eluye.

Reactivos

R₁ = Solución alcohólica de hematoxilina

Hematoxilina	0,75 g
Etanol absoluto c.s.p.	100 ml

R₂ = Solución ácido de Fe Cl₃ 6H₂O

Fe Cl ₃ 6H ₂ O	2,4 g
HCl (25%)	2 ml

R₃ = Solución acuosa de eritrosina al 0,1%

Eritrosina	0,1 g
H ₂ O destilada c.s.p.	100 ml

Método

1. Diluir la sangre tomada con EDTA -1:2 en solución salina-. Hacer frotis en portaobjetos libres de grasa.
2. Secar la lámina y fijarla en etanol al 80% durante cinco minutos. Lavar con agua de tubo o dejar secar. Una vez fijados los frotis son muy estables.
3. Al momento de usar, preparar una mezcla compuesta por dos volúmenes de R₁ y un volumen de R₂ (por ejemplo, 20 ml y 10 ml) y verterla en un Kolplin.
4. Colocar las láminas durante 20 minutos en el Koplín con la mezcla.
5. Transcurridos los 20 minutos, lavar las láminas con agua de tubo y secarlas al aire.
6. Contrateñir con la solución de eritrosina 0,1% durante dos minutos. Lavar bien con agua de tubo y dejar secar.
7. Examinar la lámina a 10 x, 40 x o 100 x.

Interpretación

La Hb fetal, al ser ácido resistente, no es eluida de los eritrocitos, y se tiñe con la eritrosina. El resto de las Hbs son eluidas y dejan sombras de glóbulos rojos que no se tiñen con la eritrosina.

Se pueden observar dos patrones de elución de Hb fetal:

- *Homogéneo*: se observa una población de células

ácido resistentes distribuida uniformemente (persistencia hereditaria de HbF o neonatos).

- *Heterogéneo o heterocelular*: hay una distribución no homogénea de células fetales ($\delta\beta$ -tal homocigota, β -tal con A_2 y F altas, Hb SS, etc.).

Los frotis de individuos normales presentan menos del 1% de células ácido resistentes, las cuales se denominan también células F.

Esta técnica permite además identificar cuerpos de inclusión (cuerpos de Heinz) que se forman en talasemia mayor o en deficiencia de G6PD.

BIBLIOGRAFÍA

Alperin LB, Dow PA, Petteway MB. Hemoglobin A_2 levels in health and various hematologic disorders. *Am J Clin Pathol* 1977; 67(3): 219-226.

Baiget M, Gimferrer E, Ruttlant M. Experiencia en la determinación de hemoglobina A_2 por microcromatografía en DEAE celulosa. *Sangre* 1978; 23(6): 864.

Bernini LF. Rapid determination of hemoglobin A_2 by DEAE-cellulose chromatography. *Biochem Genet* 1969; 2: 305-308.

Brosious EM, Wright JM, Baine RM, Schmidth RM. Microchromatography methods for hemoglobin A_2 quantitation compared. *Clin Chem* 1978; 24: 2196-2199.

Efremov GD, Huisman THJ, Bowman K, Wrightstone RN, Schroeder WA. Microchromatography of hemoglobins. II. A rapid method for the determination of hemoglobin A_2 . *J Lab Clin Med* 1974; 83(4): 657-664.

Efremov GD, Huisman THJ. The laboratory diagnosis of haemoglobinopathies. *Clin Haematol* 1974; 3: 527-542.

García B, Rubio F, Crespo MR. Técnicas de análisis hematológicos. España: Ediciones Paraninfo S.A.; 2015.

Huisman THJ, Jonxis JHP. The hemoglobinopathies: techniques of identification. New York: Marcell Dekker, Inc.; 1977.

International Committee for Standardization in Haematology (ICSH). Recommendations for fetal haemoglobin reference preparations and fetal haemoglobin determination by alkali denaturation method. *Br J Haematol* 1979; 42: 133-136.

International Committee for Standardization in Haematology. Recommendations for selected methods for quantitative estimation of Hb A_2 and for Hb A_2 reference preparation. *Br J Haematol* 1978; 38(4): 573-578.

Sáenz GF, Moreira J. Laboratorio de hemoglobinopatías. Manual latinoamericano. Costa Rica: Ministerio de Salud; 1980.

Sáenz GF, Barrantes A, Jiménez R, Montero G, Schosinsky K, Grant S, *et al.* Estudios de la hemoglobina A_2 por microcromatografía en DEAE-celulosa (DE-52). *Sangre (Barc)* 1981; 26(6): 1083-1090.

Sáenz GF, Chaves M, Rodríguez WE. Hematología analítica. 3 ed. San José, Costa Rica: Editorial Universidad de Costa Rica; 1987.

Schmidt RM, Brosious EM, Wright JM. Preparation and use of a quality control hemolysate for microchromatographic determinations of hemoglobin A_2 . *Am J Clin Pathol* 1977; 67(3): 215-218.

Villegas A, Álvarez-Salas JL, Martínez R. Método recomendado por el ICSH para la determinación de la hemoglobina fetal. *Sangre* 1983; 28(6): 796-800.

TÉCNICAS CITOQUÍMICAS PARA DIFERENCIAR LEUCEMIA AGUDA

Dra. Melissa Granados Zamora

INTRODUCCIÓN

Las técnicas citoquímicas se han utilizado para evaluar algunos procesos hematológicos malignos. Estas permiten caracterizar, en la mayoría de los casos, el estadio madurativo y/o la serie a la cual pertenece un grupo celular específico, a partir del análisis de la composición química intracelular de las células hematopoyéticas. Para estas pruebas se pueden emplear frotis de aspirados de medula ósea (MO) o de sangre periférica (SP).

REACCIÓN DE LA MIELOPEROXIDASA (MPx) (Método de Osgood et al)

La MPx es una enzima que se encuentra en los gránulos primarios de neutrófilos y monocitos, así como en los gránulos específicos de los eosinófilos y basófilos. Es la tinción citoquímica de elección para el reconocimiento de elementos mieloides y el único marcador inequívoco de esta serie.

Fundamento de la prueba

La MPx transfiere hidrógenos de la bencidina al peróxido de hidrógeno para formar agua, y la bencidina oxidada precipita en el sitio de la reacción; el precipitado puede ser verde, azul o pardo, dependiendo del grado de oxidación de la bencidina. A veces, el precipitado se observa en forma de astillas.



Reactivos

Bencidina	0,3 g
Etanol 95°	99,0 ml
Nitroprusiato de sodio	1,0 g
H ₂ O ₂ al 30%	10,0 ml
Agua destilada c.s.p.	100 ml

Disolver la bencidina, añadiendo poco a poco el alcohol. Cuando se ha disuelto, se le agrega 1 ml de la solución saturada de nitroprusiato (1 g en agua destilada. c.s.p. 1 ml) y se filtra. Se guarda en frasco ámbar, donde es estable hasta por un año si se mantiene a 4 °C. Si precipita, se puede filtrar y usar sin problema.

Nota:

El *International Council for Standardization in Hematology* (ICSH) recomienda utilizar el procedimiento que emplea la 3,3'-diaminobencidina (DAB), que tiene carcinogenicidad reducida, en comparación con la bencidina corriente.

Peróxido de hidrógeno (H₂O₂) de trabajo (preparar al momento de usarse):

Agregar cinco gotas del H₂O₂ al 3% a 25 ml de agua destilada.

Procedimiento

- Utilizar frotis finos, sin fijar, de menos de cuatro horas de efectuados.
- Colocar 10 gotas de la solución de bencidina sobre el frotis y dejar por tres minutos.
- Agregar cinco gotas del H₂O₂ diluido, homogenizar y dejar durante 1-2 minutos.

- Lavar con abundante agua del tubo (hasta que el agua de la lámina salga clara) y secar.
- Contrateñir con Wright; en este caso, el colorante se deja sobre la lámina por dos minutos, al cabo de los cuales se le pone agua o tampón; se homogeniza y se deja durante 20 minutos; se lava con agua del tubo y se seca.

Nota:

El H_2O_2 al 3% es estable por más de un año si se mantiene en botella ámbar bien tapada, a 4 °C.

Comentarios

- En extensiones de más de un día, la actividad de la enzima disminuye de manera gradual.
- La cantidad de H_2O_2 tiene que medirse cuidadosamente; si es mayor de lo indicado, destruye la enzima; si es menor, la reacción puede ser débil o negativa, circunstancia que también puede darse si el H_2O_2 no es de preparación reciente.

Interpretación

- La MPx se encuentra en toda la serie granulocítica normal, a partir del progranulocito, y en los blastos de la leucemia mieloide aguda (M1, M2, M3, M4, M5, M6).

- En la serie monocítica la reacción puede ser positiva (menos intensa que la de serie granulocítica) o negativa.
- La granulación de la serie granulocítica es gruesa y la de los blastos es variable.
- La MPx es la técnica más sensible que hay para la detección de la serie mieloide.
- Reacciones disminuidas o negativas de la MPx en serie granulocítica se pueden observar en: deficiencias congénitas de la enzima (raras) y en hemopatías graves como el síndrome mielodisplásico (SMD) y la leucemia mieloide aguda (LMA) o en infecciones, como consecuencia de alteraciones genéticas. En la forma hereditaria de deficiencia de MPx, los neutrófilos y monocitos son deficientes, pero la MPx de los eosinófilos no se ve afectada.
- Se cree que la deficiencia de MPx es un problema autosómico. En los casos homocigotos, la enzima no se detecta en los neutrófilos, mientras que en los casos heterocigotos, todos los neutrófilos presentan actividad enzimática disminuida, no ausente.
- La MPx es de gran valor en el diagnóstico diferencial de las leucemias linfoides (negativas) y mieloides, sobre todo, para diferenciar la LLA2 de la LMA-M1. En el primer caso, la reacción es negativa.
- Se considera que la reacción es positiva cuando hay más del 3% de blastos que muestran precipitación o astillas de bencidina.

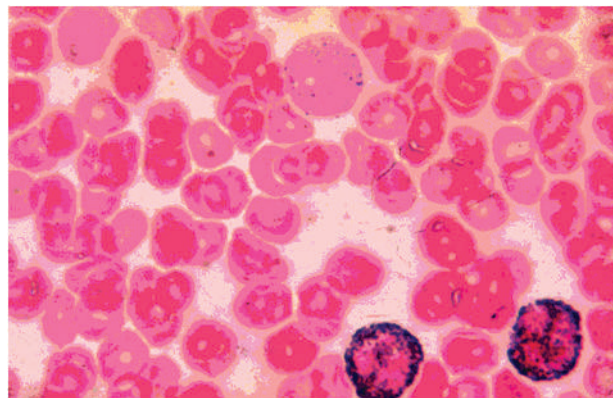
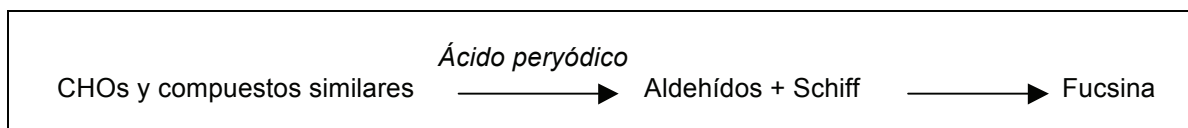


Figura N° 1. Reacción de mieloperoxidasa positiva en granulocitos.

REACCIÓN DEL ÁCIDO PERYÓDICO DE SCHIFF (PAS) (Método de McManus y Hotchkis, modificado)

Fundamento de la prueba

El ácido peryódico oxida carbohidratos y compuestos similares, pasándolos a aldehídos. Estos reaccionan con el reactivo de Schiff (leuco-fucsina) para liberar fucsina, que tiñe de rojo los componentes celulares que presentan grupos oxidables.



Varios componentes intracelulares reaccionan con el reactivo de PAS, pero en las células sanguíneas de sangre periférica y MO, el glucógeno es el principal compuesto responsable; dicha reacción se puede bloquear por digestión con amilasa.

La reacción puede ayudar a identificar algunos casos de leucemia linfocítica aguda (LLA) y algunos subtipos de LMA.

Reactivos

Reactivo de Schiff

Agua destilada en ebullición	200 ml
Fucsina básica (<i>Fuchsin basic</i> Cl 42.500, BDH)	1,0 g
Metabisulfito de Sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$)	2,0 g
HCl concentrado	1,0 ml
Carbón activado	1,0 g
Ácido Peryódico	1,0 g

- Se recomienda retirar el agua del fuego y agregar lentamente la fucsina, para evitar la formación de violentas burbujas que se producen al agregar este reactivo al agua.
- Enfriar luego a 60 °C y añadir 2 g de metabisulfito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) y 1,0 ml de HCl concentrado; agitar bien.
- Guardar la solución anterior en la oscuridad por 18-24 horas. Al cabo de este tiempo, presenta un color amarillo pálido con un fuerte precipitado rojo.
- Agregar 1,0 g de carbón activado, agitar 10 minutos y filtrar. Si el filtrado no es transparente, repetir este paso hasta conseguirlo. La solución es estable por varios meses a 4 °C en botella ámbar.

- Colocar las láminas en una jarra “coplin” que contenga azul de metileno al 1% durante 15 minutos; lavar y secar.

Preparación de control negativo

Luego de fijados y lavados los frotis, se cubren con una solución de amilasa (que se puede obtener de la saliva) por 30 minutos.

Este control negativo es muy importante para confirmar la presencia de células de Sézary, que son diastasa resistentes.

Interpretación

- Serie granulocítica: el citoplasma del neutrófilo se tiñe intensamente de color rosado o rojo, con apariencia granular en algunas células. En la MO normal los precursores granulocíticos más inmaduros no se tiñen; la tinción del citoplasma de estas células se incrementa conforme maduran.
- Los monocitos se tiñen de rosado difuso y, a veces, pueden contener gránulos finos o gruesos.
- En los megacariocitos la tinción es difusa, intensamente rosada o roja; las plaquetas se tiñen intensamente.
- Los precursores eritrocíticos normales no se tiñen.
- El núcleo y el citoplasma de todas las células se tiñen de azul.
- En la LLA esta reacción es muy variable; en el 50% de los casos, al menos 5% de los blastos contienen gránulos gruesos o grandes bloques de material PAS-positivo, diastasa sensible.
- Una reacción positiva se puede observar en casos de LLA1 o LLA2; sin embargo, la LLA3 por lo

Ácido peryódico al 1%

Ácido Peryódico	1,0 g
Agua destilada c.s.p.	100 ml

Procedimiento

- Fijar con metanol absoluto por 20 minutos y lavar durante 15 segundos con agua destilada en una jarra “coplin”; escurrir y dejar secar. Otra manera es usar el fijador formol-citrato-acetato por 30 segundos y lavar con agua de tubo por 30 segundos.
- Cubrir el frotis con ácido peryódico por 10 minutos; lavar ligeramente con agua destilada y escurrir.
- Cubrir el frotis con el reactivo de PAS y dejar 40-50 minutos en la oscuridad.
- Colocar las láminas en una jarra “coplin” por 10 minutos con agua corriente, para diferenciación. En este tiempo se efectúan dos cambios de agua corriente y luego se secan las láminas.

general es negativa. Las implicaciones pronósticas de una reacción positiva son controversiales.

- Los linfoblastos son peroxidasa y sudán negro B negativos. Por eso, el diagnóstico de LLA es fuertemente sugerido cuando los blastos son peroxidasa y SNB negativos, aún cuando el PAS es negativo.
- En la LMA el grado de reactividad del PAS en los blastos es variable. Los blastos de la LMA-M₁ y M₂ por lo general son negativos, aunque algunos pocos blastos pueden presentar un tinte difuso con o sin finos gránulos. Este último patrón se observa a menudo en células leucémicas de la LMA-M₃.
- En las LMA-M₄ y LMA-M₅ la reacción del PAS puede ser negativa en algunos casos y fuertemente positiva en otros; cuando es positiva, el citoplasma del monoblasto muestra numerosos gránulos pequeños.
- En la LMA-M₄ (leucemia mielomonocítica aguda con eosinofilia) los gránulos de los eosinófilos son positivos.
- En la LMA-M₆ un número variable de precursores eritrocíticos suelen mostrar una intensa reacción al PAS. La tinción es granular en los precursores tempranos, y difusa en los precursores eritroides tardíos.
- Los eritroblastos normales son PAS negativos, al igual que en la mayoría de desórdenes hematológicos, pero pueden ser PAS positivos en talasemia y, ocasionalmente, en la deficiencia de hierro. Con esta excepción, la actividad de PAS en precursores eritroides por lo general refleja una proliferación clonal (neoplásica) de los eritroblastos (eritroleucemia, leucemia mieloide aguda o un SMD).
- En la LMA-M₇ las células blásticas generalmente muestran una reacción positiva difusa y granular, con gruesos gránulos periféricos.

SUDÁN NEGRO B (SNB)

(Método de Sheehan y Storry)

La reacción del SNB es importante como una prueba alternativa en la investigación de casos de LMA que son MPx negativos, sobre todo cuando se trata de alteraciones genéticas adquiridas, como las vistas en enfermedades clonales (SMD, LA y otras); sin embargo, es de escaso valor cuando la MPx citoplasmática se ha excluido por técnicas de fenotipo intracelular.

Fundamento de la prueba

El Sudán negro B es una sustancia colorante neutra de la serie diazoica, que tiñe diversos lípidos, como esteroides, grasas neutras y, en particular, fosfolípidos. El estrecho paralelismo entre la positividad de las reacciones de SNB y la mieloperoxidasa, se ha relacionado con el hecho de que ambas reacciones citoquímicas son positivas en los gránulos azurófilos de los neutró-

filos y monocitos y en los gránulos específicos de los eosinófilos.

Se desconoce el mecanismo bioquímico de la reacción; no obstante, hay dos teorías que tratan de explicarlo:

- a) El SNB tiñe los lípidos de los gránulos que contienen la enzima mieloperoxidasa.
- b) La coloración se efectúa a través de un mecanismo enzimático, tal vez unido a la mieloperoxidasa y no solo por la solución física en los lípidos.

Ambas reacciones, MPx y SNB, son positivas en las células mieloides maduras e inmaduras, y por consiguiente, son de utilidad en el diagnóstico diferencial y en la clasificación de las leucemias agudas linfoides y no linfoides.

Reactivos

Solución de Sudán negro B

Sudán negro B	0,3 g
Etanol absoluto	100 ml

Se disuelve y se filtra.

Solución de fosfatos

Na ₂ HPO ₄ × 12H ₂ O	0,3 g
Agua destilada c.s.p.	100 ml

Disolver 16 g de fenol (cristales) en 30 ml de etanol absoluto y agregarlos a la solución de fosfatos.

Fijador

- Formalina al 40% o una mezcla de etanol absoluto (nueve partes) y formalina 40% (una parte). Si se usa la mezcla, la fijación es por cinco minutos.
- Si se usa formalina al 40% (vapores), se empapa un papel filtro con formalina y se escurre; este papel queda dentro del recipiente y luego se colocan los frotis a fijar (MO o SP) en la jarra "coplin". Se pone en una incubadora a 37 °C durante 10 minutos. Lavar por 5-10 minutos en la jarra "coplin" con agua del tubo.

Solución de trabajo de SNB

Solución de Sudán negro B	60 ml
Solución de fosfatos	60 ml

Se filtra la mezcla que debe ser neutra o ligeramente alcalina. La solución se mantiene por varios meses a 4 °C, en botella ámbar.

Procedimiento

- Colocar el reactivo sobre las láminas fijadas por 30 a 60 minutos (en la oscuridad), o sumergirlas en una jarra "coplin" con el reactivo.
- Escurrir el colorante de las láminas y cubrirlas con etanol al 70% por dos minutos, para quitar el exceso de colorante. Repetir una vez más; lavar con agua del tubo y contrateñir con azul de metileno al 1% o practicarle al frotis una tinción de Wright.

Interpretación

- Los linfocitos y los eritrocitos no se tiñen con el SNB. Los precursores de la serie granulocítica normal, a partir de la etapa de progranulocito, muestran aumento en la sudanofilia que corresponde más o menos a los gránulos presentes en las tres series (neutrófila, eosinófila y basófila) y permanecen hasta que la célula está completamente diferenciada.
- Los progranulocitos contienen unos pocos gránulos sudanofílicos, mientras que los segmentados neutrófilos poseen gran número de gránulos sudan positivos. Los eosinófilos son también intensamente sudanofílicos.
- En general, la sudanofilia es paralela a la reac-

ción de las peroxididasas.

- Los gránulos sudanófilos se tiñen de color café grisáceo o negro y parece que su distribución y número son idénticos a los de la granulación específica.
- En los monocitos, la tinción puede ser negativa o tener pocos gránulos sudanofílicos.
- En la mayoría de los casos de leucemia granulocítica aguda, casi todos los mieloblastos son sudanófilos. Algunos blastos se tiñen intensamente con un patrón similar al de los segmentados neutrófilos, mientras que otros muestran una positividad citoplasmática de variable intensidad. Unos pocos tienen gránulos discretos, semejantes a los que se observan en los monocitos.
- Estos gránulos son particularmente conspicuos en el área yuxtanclear y usualmente concentrados entre los lóbulos de los núcleos en los paramieloblastos.
- Los cuerpos de Auer son intensamente sudanofílicos.
- En la leucemia monocítica aguda, el 5% o más de los blastos contiene un discreto número de gránulos dispersos por el citoplasma, semejantes a los que se ven en monocitos normales.
- Otras células primitivas en la leucemia monocítica aguda muestran una tinción similar a la de los granulocitos diferenciados.
- En la leucemia linfocítica aguda los linfoblastos son negativos (solo un porcentaje menor al 3% suele ser positivos).

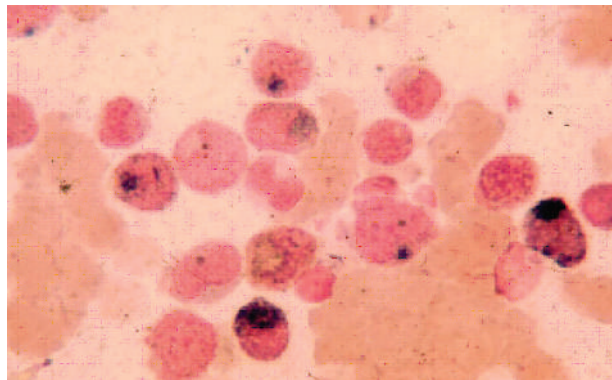


Figura N° 2. Reacción del Sudán negro B positiva en granulocitos.

PREPARACIÓN DEL FIJADOR FORMOL-CITRATO-ACETONA

Este fijador se utiliza para la mayoría de las reacciones histoquímicas, tales como: fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina, esterases y, si se desea, para la realización de PAS y tinciones de hierro en MO.

Reactivos

Tampón para el fijador, pH 5.35

Ácido cítrico monohidratado	0,378 g/100 ml
Citrato trisódico dihidratado	0,2646 g/100 ml

Colocar el citrato en un beaker y añadir el ácido cítrico hasta obtener un pH 5.45. Por cada 100 ml del tampón, agregar 0,0702 g de NaCl. Con esto el pH queda alrededor de 5.35 (debe ser de 5.35+- 0.1).

Fijador

Tampón citrato pH 5.35	100,0 ml
Acetona	260,0 ml
Formalina al 37%	32,0 ml

Si se mantiene bien tapado, este reactivo es estable en botella ámbar por más de un año en refrigeración.

Nota:

Antes de usarlo debe estar a temperatura ambiente.

FOSFATASA ÁCIDA (FAC) (Método de Golberg y Barka)

Fundamento de la prueba

La fosfatasa ácida de las células hemopoyéticas puede hidrolizar una variedad de anilinas hidroxinaftólicas. Se localiza en los lisosomas de las células linfocíticas y en algunos precursores eritroides. Al inducir hidrólisis, esta enzima libera naftoles insolubles, que se acoplan eficientemente a sales de diazonio a pH ácido. El producto de dicho acople es un precipitado coloreado en el sitio donde se encuentra la enzima.

El ácido tartárico inhibe las isoenzimas 1, 2, 3 y 4 de la FAC, pero no la isoenzima 5 (de las células peludas).

Este método utiliza como sustrato el naftol AS-BI fosfato y como colorante de acople la pararrosanilina de hexazonio

Reactivos

Solución tampón concentrada

Acetato de sodio $\times 3H_2O$	0,975 g
Barbital sódico	1,475 g
H ₂ O desionizada c.s.p.	50,0 ml

Llevar la solución anterior a pH 5.0 con HCl 0.1 N (se utilizan aproximadamente 88 ml de este), con lo cual se forma un precipitado. Añadir 20 ml de NaCl al 0,85% y llevar a volumen final de 250 ml con agua desionizada, en donde desaparece el precipitado.

Pararrosanilina al 4% en HCl 2N

Pararrosanilina	0,4 g
HCl 2N	10 ml

Sustrato

Naftol AS-BI fosfato (Sigma N° N-2250)	0,025 g
N,N dimetilformamida	2,5 ml

NaNO₂ a 4%

Se debe preparar al momento de usarlo, a partir de solución madre al 20% (0,5 ml de reactivo en 2,5 ml de agua destilada)
Azul de metileno al 1%

Solución de trabajo

Tampón pH 5.0	15,4 ml
Sustrato	0,4 ml
Agua destilada	5,4 ml
*Pararrosanilina hexazotizada	0,6 ml
Mezclar bien y llevar a pH 5.0 con NaOH 1 M/L.	

*Pararrosanilina hexazotizada

NaNO ₂ recién preparado	0,3 ml
Solución pararrosanilina 4%	0,3 ml
Mezclar 30 segundos en un vortex; dejar en reposo por dos minutos antes de usar.	

Procedimiento

- Los frotis se pueden hacer a partir de sangre con EDTA o sin anticoagulante. También se pueden utilizar frotis de MO.
- Fijar las láminas por 30 segundos con el fijador citrato-acetona-formalina.
- Lavar con agua destilada por 10-15 segundos.
- Incubar en estufa a 37 °C por una hora con solución de trabajo, previamente filtrada, y en la oscuridad; también se puede realizar a temperatura ambiente en oscuridad durante dos horas en una jarra "coplin".
- Lavar bien con abundante agua de tubo y contra-teñir con azul de metileno al 1%, durante tres a cuatro minutos.

Prueba de la resistencia al tartrato

Ácido L tartárico	75,0 mg
Solución de trabajo (previamente filtrada)	10,0 ml

La mezcla anterior se coloca sobre los frotis en estudio y se sigue el mismo procedimiento de la fosfatasa ácida, simultáneamente a esta.

Nota:

En la mayoría de casos de leucemia de células peludas y en un tercio de las leucemias prolinfocíticas de estirpe B (LPLB), se observa que las células son tartrato resistentes. Por el contrario, en sangre periférica normal no se han encontrado este tipo de células.

Interpretación

- La actividad de la fosfatasa ácida (FAC) se demuestra por un precipitado rojo granular, que se observa en la mayoría de las células hemopoyéticas.

ticas.

- Actividad intensa se observa en osteoclastos y macrófagos.
- Actividad moderada se presenta en células plasmáticas, megacariocitos y monocitos.
- Reacción débil ocurre en neutrófilos, bandas, mielocitos, metamielocitos y progranulocitos.
- Actividad muy débil de la FAC se observa en linfocitos normales y eritroblastos.
- Actividad elevada se puede encontrar en los siguientes linfocitos patológicos: tricoleucocitos, linfocitos de pacientes con macroglobulinemia, linfocitos estimulados de la mononucleosis infecciosa, linfoblastos T (dan reacción polar), prolinfocitos de la LPLT y LLCT. La reacción en estos casos es de tipo polar, es decir, localizada en la zona de Golgi.
- En las células peludas (tricoleucocitos) la reacción es difusa y no se inhibe con el tartrato. Sin embargo, no todas las tricoleucemias son tartrato resistentes.
- Se ha observado tartrato resistencia ocasionalmente en algunos desórdenes linfoproliferativos.
- Los linfoblastos de las LLA-B dan la reacción débil difusa o negativa.

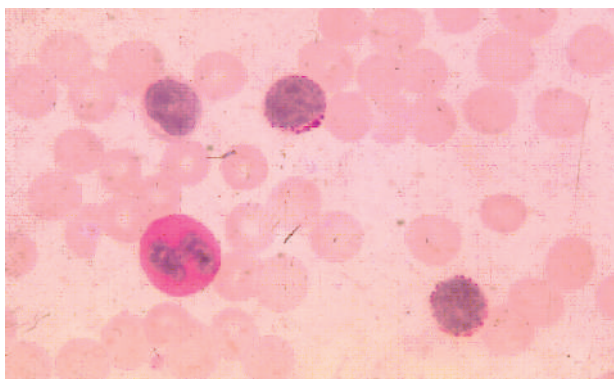


Figura N° 3. Reacción de fosfatasa ácida positiva en una LLA.

TÉCNICA DE ESTERASAS

Las esterasas son enzimas hidrolíticas que desdoblan diferentes ésteres en sus componentes ácidos y alcoholes. En la identificación de estas enzimas se han utilizado distintos sustratos: naftol-AS-D-cloroacetato; naftol-AS-acetato; naftol-AS-D-acetato: alfa naftil acetato y alfa naftil butirato.

Se han descrito nueve isoenzimas de las esterasas en los leucocitos: las isoenzimas 1, 2, 7, 8 y 9 representan las esterasas *específicas*, las cuales se encuentran en los granulocitos y se evidencian por medio del naftol-AS-D-cloroacetato. Las isoenzimas 3, 4, 5 y 6, por su

parte, corresponden a las esterasas *no específicas* y se evidencian por los ésteres, ya sean de alfa naftol, naftil acetato o butirato, los cuales se inhiben con el fluoruro de sodio (NaF) y se encuentran en monocitos, megacariocitos y plaquetas. La típica reacción focal en los linfocitos T no se inhibe con el NaF.

Fundamento de la prueba

Las esterasas de los leucocitos hidrolizan sustratos sintéticos (ésteres de naftaleno), liberando moléculas de naftol o naftil que rápidamente se acoplan a sales de diazonio, presentes en la mezcla reactiva, originando un precipitado de color intenso en o cerca del sitio donde está la enzima.

Alfa naftil-acetato esterasa (ANAE) (Método Yam et al)

Reactivos

Solución A

Tampón de fosfatos pH 6.6,	0,67 M/L
Na ₂ HPO ₄	0,947 g
Agua destilada c.s.p	100 ml

Solución B

KH ₂ PO ₄	0,907 g
Agua destilada c.s.p.	100 ml

Llevar la solución B a pH 6.6, agregando poco a poco la solución A.

Sustrato

Alfa-naftil acetato (Sigma N° N-6750)	0,1 g
2 –Metoxietanol	5,0 ml

Pararosanilina al 4% en HCl 2N

Pararosanilina	0,4 g
HCl 2N	10 ml

Solución de trabajo

Pararosanilina al 4%	0,5 ml
NaNO ₂ al 4%	0,5 ml

Mezclar en vórtex por 30 segundos: dejar en reposo por un minuto y agregar a la siguiente solución:

Tampón de fosfatos	15,0 ml
ANAE	0,84 ml

Ajustar el pH a 6.3 con NaOH 1 M/L; filtrar antes de usar (el filtrado debe estar transparente).

Nota:

El pH puede estar entre 6.1 y 6.3.

Procedimiento

- Se emplean frotis de SP o MO fijados por 30 segundos con formol-citrato-acetona, el cual debe

estar entre 18-26 °C.

- Lavar con agua destilada por 30 a 60 segundos y secar.
- Incubar 45 minutos a temperatura ambiente con la solución de trabajo.
- Lavar durante cuatro minutos con agua del tubo y contrateñir durante tres minutos con azul de metileno al 1%.

Inhibición con NaF

NaF	30 mg (10 mg)
Solución de trabajo	20 ml (6,7 ml)

Se continúa el procedimiento descrito anteriormente con esta solución, de forma simultánea con la reacción del ANAE.

Interpretación de la prueba

- Las esterasas monocíticas (EM) (inespecíficas) y un grupo de esterasas presentes en muchas células hemopoyéticas, llamadas esterasas comunes (Ecom), hidrolizan el alfa-naftil acetato. Sin embargo, las Ecom difieren de las EM porque muestran grados variables de resistencia a la inhibición con el NaF, mientras que las EM son sensibles a este. Por tanto, si blastos ANAE positivos no se inhiben con el NaF, se puede concluir que esta positividad se debe a la presencia de Ecom. No obstante, la situación contraria en que se demuestran blastos NaF sensibles, no necesariamente implica la presencia de EM.
- En los monocitos normales, la reacción de ANAE es difusa, de color rojo oscuro o café (a veces el color es pardo).
- El alfa-naftil acetato es un excelente sustrato para identificar la serie monocítica y sus precursores.
- La serie granulocítica normalmente no da la reacción, pero en estados de dishemopoyesis puede mostrar tinción granular o difusa.
- Los blastos de la LMA: M0, M1 y M2 suelen ser negativos; sin embargo, en una pequeña proporción de casos los blastos pueden presentar una significativa tinción granular o de tipo focal.
- Los progranulocitos de la LMA-M3 hipergranular a menudo muestran positividad (gránulos finos o tinción difusa), mientras que los progranulocitos del subtipo hipogranular por lo general son ANAE negativos. La positividad en estos subtipos de LMA se deben a una expresión incrementada de las Ecom y muestran grados variables de resistencia al NaF.
- Los blastos de las LMA M4 y M5 muestran una reacción difusa de moderada a fuerte, que es sensible al NaF.

- Los megacarioblastos de la LMA-M7 pueden presentar una reacción de ANAE focal, parecida a la de los blastos de la LMA-M6.
- En la LLA-B los blastos suelen ser negativos, aunque algunos casos pueden mostrar gránulos gruesos o actividad débil difusa. En una proporción de casos de LLA-T se puede ver una reacción focal (polar), generalmente débil a moderada, con sensibilidad variable al NaF.
- Los blastos de la LMA-M₇ dan una reacción polar con el ANAE.

Naftol AS-D-cloro-acetato-esterasa (NASDCAE) (Método de Yam et al)

Las esterases específicas, presentes en los granulocitos y células cebadas, se pueden demostrar usando como sustrato el naftol AS-D-cloro-acetato y como agentes de acoplamiento diferentes sales de diazonio: *fast garnet GBC*, *fast red violet* o *fast blue BB salt*. La enzima es activa a pH 7.0-7.6 y no se inhibe con el NaF. En general, esta reacción corre paralela a las tinciones de Sudán negro B y de MPx.

Reactivos

Sustrato

Naftol AS-D-cloroacetato (Sigma N° N-0758)	0,02 g
N,N-dimetilformamida	10 ml

Estable por más de seis meses a 4 °C, en botella ámbar.

Tampón de fosfatos pH 7.7, 0.67 M/L

Solución A:

Na ₂ HPO ₄	2,3675 g
Agua destilada c.s.p.	250,0 ml

Solución B:

KH ₂ PO ₄	2,2675 g
Agua destilada c.s.p.	250 ml

Llevar la solución B a pH 7.7, agregando poco a poco la solución A.

Solución de trabajo

Tampón de fosfatos	9,5 ml
<i>Fast Blue BB salt</i>	0,05 g
Sustrato	0,5 ml

Mezclar bien, filtrar y usar inmediatamente.

Procedimiento

- Fijar los frotis de SP o MO por 30 segundos con el fijador formol-citrato-acetona.
- Lavar por 30-60 segundos con agua destilada.
- Cubrir las láminas escurridas o secas con el reactivo filtrado y dejar por 30 minutos a temperatura ambiente.
- Lavar con abundante agua del tubo.
- Contrateñir con safranina al 1% por cuatro minutos.
- Interpretación
- La reacción es positiva en elementos normales de la serie granulocítica, a partir del progranulocito, y se manifiesta por una granulación azul en el citoplasma, la cual contrasta con el rojo del núcleo y el del citoplasma.
- En linfocitos normales y en linfoblastos la reacción es invariablemente negativa.
- La cloroacetato esterasa no es tan específica como la mieloperoxidasa (MPx) para la detección de elementos tempranos de la serie granulocítica; sin embargo, una reacción de MPx positiva y NASCAE negativa constituye el patrón típico de la LMA-M1.
- Los blastos de la LMA-M2 muestran una tinción variable con esta reacción.
- En la LMA-M3 hipergranular, la reacción de NASCAE es intensa, mientras que en la variante hipogranular es débil.
- Los blastos de las LMA-M4 y M5 son típicamente negativos, aunque algunos casos de LMA-M5 con fuerte actividad de ANAE, pueden dar cierta positividad con NASCAE, debido a la hidrólisis "no específica" del sustrato.
- El empleo a nivel tisular es de gran valor para diferenciar tejido granulocítico, tal como sucede con las masas tumorales del cloroma y en los procesos de granulopoyesis extramedular.
- Diversos investigadores han reportado que esta reacción es de utilidad para diferenciar las raras leucemias de eosinófilos de las eosinofilias reactivas, ya que solo en el primer caso la reacción es positiva. Esta reacción también la dan positiva las células cebadas.

Esterasas dobles

Se emplean los mismos reactivos utilizados en la prueba de ANAE y CAE.

Procedimiento

- Los frotis se fijan con el fijador formol-citrato-acetona por 30 segundos y se lavan con agua del tubo por 30 segundos.
- Cubrir los frotis con el reactivo de ANAE y dejar durante 45 minutos.
- Lavar con suficiente agua destilada.
- Secar los frotis.
- Cubrir la lámina anterior con el reactivo de la CAE por 30 minutos.
- Lavar con agua destilada del tubo.
- Contrateñir con azul de metileno al 1% por 3,5 minutos.

Interpretación

La serie monocítica aparece de color naranja o pardo y la serie granulocítica de color azul.

FOSFATASA ALCALINA LEUCOCITARIA (FAL) (Método de Ernest Beutler)

Esta prueba se usa para diferenciar la leucemia mieloide crónica (LMC) de:

- Reacciones leucemoides observadas en infecciones severas.
- Policitemia vera.
- Trombocitemia esencial.
- Mielofibrosis primaria con metaplasia mieloide.

Fundamento de la prueba

La fosfatasa alcalina hidroliza el sustrato naftol AS-BI fosfato, produciendo fosfato y una aril naftolamida. La última se acopla a una sal de diazonio, por ejemplo *fast red violet LB* (5-benzamida-4-cloro-2-toluidina diozotizada), y origina un colorante insoluble, que se visualiza fácilmente sobre los neutrófilos que tienen actividad de fosfatasa alcalina.



Reactivos

- Naftol AS-BI fosfato.
- Tris 2-amino-2(Hidroximetil) propano 1,3 diol.
- Fast red violet salt LB o Fast violet B salt.
- N-N-dimetilformamida, grado reactivo.
- HCl 1,0 M.
- Azul de metileno 1%.

Tampón Tris para el sustrato 0.3 M

Tris 2-amino-2(Hidroximetil) propano 1,3 diol	24,3 g
Agua destilada c.s.p.	350 ml

Se ajusta el pH a 9.0 con HCl 1.0 M.

Solución Stock de sustrato

Naftol AS-MX fosfato	0,03 g
N-N-dimetilformamida	0,5 ml
Tampón Tris c.s.p.	100 ml

Solución de trabajo

Solución Stock de sustrato	10 ml
<i>Fast red violet LB salt</i>	0,010 g

Se prepara cuando se va a utilizar. Filtrar y usar inmediatamente.

Procedimiento

- Preparar frotis sanguíneos a partir de sangre capilar o heparinizada.
- Fijar los frotis (que tengan menos de 24 horas) por 30 segundos con la solución fijadora, que debe estar a temperatura ambiente. Los frotis fijados se pueden guardar por 2-3 semanas en congelación, con menos de 10% de pérdida de actividad.
- Lavar por un minuto con agua del tubo; secar al aire. Es preferible teñir de inmediato.
- Teñir los frotis por 10 minutos exactos con la mezcla de tinción. Lavar con agua del tubo y contrateñir por cinco minutos con la solución de azul de metileno al 1%.

Cuadro N° 1. Criterios para establecer el puntaje de la FAL				
Rango Celular	Precipitado Azo en el citoplasma			
	Cantidad (%)*	Tamaño del gránulo	Intensidad tinción	Aspecto del citoplasma
0	0	0	0	No se tiñe
1+	< 50	Pequeño	Débil	Rosado pálido
2+	50-80	Pequeño a mediano	Moderada	Sin color rosado pálido
3+	80-100	Mediano a grande	Fuerte	Sin color rosado
4+	100	Mediano y grande	Brillante	No visible

* Porcentaje del citoplasma ocupado por el colorante azo.

- El puntaje final se obtiene multiplicando la cantidad de células de cada rango por el número del rango respectivo, y al final sumando cada valor. Observar el ejemplo del Cuadro N° 2.

Cuadro N° 2. Ejemplo de los cálculos para obtener el puntaje de la FAL		
Rango	Cantidad de células	Multiplicación
0	10	0
1+	58	58
2+	25	50
3+	6	18
4+	1	4
	FAL (sumatoria)=	130

Nota:

Siempre es necesario correr un control de un paciente sano.

Interpretación

- Se observan citoplasma y núcleo azul con gránulos de color rojo.
- Pacientes con LGC sin tratar, generalmente tienen un score (puntaje) entre 0 y 13.
- Pacientes con policitemia vera, trombocitemia esencial y metaplasia mieloide, así como en la leucocitosis de la infección, suelen encontrarse en el rango superior normal o francamente elevados.
- Los pacientes con HPN presentan recuentos muy bajos de FAL.
- Valores de referencia: de 13 a 130 puntos. Estos se deben determinar en cada laboratorio, ya que pueden variar con los colorantes de acople empleados y con diferentes lotes de colorante.
- Control negativo: sumergir los frotis fijados en agua a ebullición por un minuto.
- Controles altos: se obtienen de pacientes en el tercer trimestre de embarazo o en los días posteriores al parto.

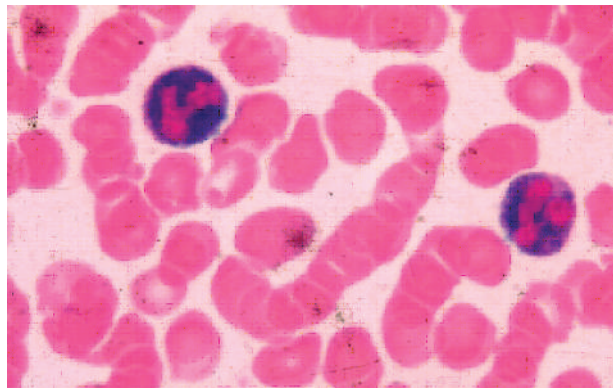


Figura N° 4. Reacción de la fosfatasa alcalina leucocitaria.

BIBLIOGRAFÍA

Alvarado MA, Arroyo G, Sáenz GF. Técnicas citoquímicas: métodos e interpretaciones. En: Sáenz GF. Hematología analítica. 3 ed. San José, Costa Rica: EDNASSS; 1995. p. 201-212.

Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, *et al.* Criteria for the diagnosis of acute leukemia of megakaryocyte lineage (M7). A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Int Med* 1985; 103(3): 460-462.

Beutler E. Leukocyte alkaline phosphatase. En: Beutler E, Lichtman MA, Collier BS, Kipps TJ (editores). *Williams Hematology*. 5 ed. New York: McGraw-Hill Inc.; 1995.

Bradford C. Citoquímica. En: Rodak B. Hematología; fundamentos y aplicaciones clínicas. 2 ed. Argentina: Editorial Médica Panamericana S.A.; 2002.

Dacie JV, Lewis SM, Catovsky D. Citoquímica de las células sanguíneas y técnicas suplementarias. En: Dacie JV, Lewis SM. Hematología práctica. 3 ed. Barcelona: Ediciones Toray, S.A.; 1987. p. 93-108.

Eys JV, Pullen J, Head D, Boyett J, Crist W, Fallella J, *et al.* The French-American-British (FAB) classification of leukemia. The pediatric oncology group experience with lymphocytic leukemia. *Cancer* 1986; 57(5): 1046-1051.

Li CY, Lam KW, Yam LT. Esterase in human leukocytes. *J Histochem Cytochem* 1973; 21(1):1-12.

Scott CS, Den Ottolander GJ, Swirsky D, Pangalis GA, Vives Corrons JL, de Pasquale A, *et al.* Recommended procedures for the classification of acute leukaemias. International Council for Standardization in Haematology (ICSH). *Leuk Lymphoma* 1993; 11(1-2): 37-50.

Yam LT, Li CY, Crosby WH. Cytochemical identification of monocytes and granulocytes. *Am J Clin Pathol* 1971; 55(3): 283-290.

ESTUDIO DE LA HEMOSTASIA PRIMARIA Y AGREGACIÓN PLAQUETARIA

*Dr. Rafael Jiménez Bonilla
Dr. Walter Cartín Sánchez*

GENERALIDADES

Para iniciar el estudio de laboratorio de un paciente con diátesis hemorrágica, debe recordarse que los problemas de sangrado pueden ser producidos por alteraciones de los vasos sanguíneos, de las plaquetas o por defecto del mecanismo de la coagulación sanguínea. Además, debe tenerse presente que las alteraciones podrían ser hereditarias o adquiridas. Los problemas adquiridos siempre son más frecuentes que los hereditarios, pero como ambos se estudian igual desde el punto de vista del laboratorio, no va a hacerse diferencia entre ellos a la hora de explicar la metodología que se sigue.

ABORDAJE DE UN PACIENTE QUE SANGRA

A todo paciente que presenta una diátesis hemorrágica deben hacerse estudios de laboratorio y, al mismo tiempo, una historia clínica bien dirigida, para conocer cuándo comenzó a sangrar y si su familia ha tenido o no problemas de sangrado.

Para ello, lo primero que se debe anotar es la edad actual del paciente y la de las primeras manifestaciones clínicas. Además, es importante consultar si el sangrado ha sido en piel y mucosas o en músculo y articulaciones, y si ha sido por un solo sitio o por múltiples lugares concomitantemente. También es relevante saber si el sangrado se produjo después de un trauma o una cirugía o si fue espontáneo.

Una vez efectuadas las pruebas de laboratorio, se recomienda clasificar a los pacientes en sangrados leves, moderados o severos, lo cual permitirá hacer un mejor diagnóstico y ayudará mucho al médico para determinar las pautas a seguir. Al respecto, cabe mencionar que casi todos los pacientes con sangrado severo poseen deficiencias marcadas de un factor o presentan un inhibidor de este.

El médico siempre deberá tomar en cuenta si existe una enfermedad de fondo que explique el sangrado y tendrá que identificar el riesgo de sangrado del paciente y si su vida corre peligro. A la vez, deberá planear el diagnóstico para manejarlo de la forma más científicamente posible.

No todos los pacientes con deficiencia hereditaria de un factor de la coagulación presentan sangrado en los primeros meses de vida. Muchos de ellos, por ser casos leves o moderados, llegan a presentar su primer sangrado en etapa escolar y, en algunas ocasiones, hasta después de ella. Por otra parte, la historia familiar de sangrado a veces es negativa, porque en la familia no hubo varones durante una o más generaciones, como podría ser el caso de algunos hemofílicos.

Lo otro que debe tenerse presente es el tipo de sangrado. Los sangrados en piel y mucosas, por lo general están relacionados con disminución o afuncionalidad de las plaquetas; mientras que los sangrados en músculo y articulaciones se presentan sobre todo en personas con deficiencia de factores de la coagulación.

También se debe considerar el sexo, porque las hemofilias se presentan solo en varones, en cambio, la enfermedad de von Willebrand y otras deficiencias de factores pueden presentarse en mujeres.

Dentro de las deficiencias de los factores de la coagulación hay dos variantes dignas de discutir: la deficiencia hereditaria de factor XII y la del factor XIII. La primera presenta un TTP prolongado y un TP normal, pero son personas sin alteraciones clínicas, debido a que el factor XII no interviene activamente en la coagulación sanguínea y solo sirve para activar la fibrinólisis. Por su parte, los pacientes con deficiencia de factor XIII presentan un tipo de sangrado particular, que se produce un tiempo después de una herida o traumatismo; esto debido a que la sangre del paciente coagula bien, pero el coágulo no consigue estabilizarse, por lo que comienza el sangrado.

Quienes tienen deficiencia de factor XIII, por lo general sangran desde pequeños por el cordón umbilical y producen cicatrices queloides. Lo importante de estos casos es que todas las pruebas de laboratorio son normales, incluyendo el TP y el TTP, y para hacer el diagnóstico de estos casos es necesario montar una prueba específica de solubilidad del coágulo en urea al 0.5 M. En los pacientes con deficiencia del factor XIII el coágulo se disolverá en horas, mientras que en las personas normales el coágulo estará todavía visible incluso al día siguiente.

Es importante recalcar que la gran mayoría de pacientes que sangran lo hacen por causas adquiridas, donde por lo general hay deficiencia múltiple de factores de la coagulación, e incluso, como en los casos de coagulación intravascular diseminada (CID), también las plaquetas están disminuidas.

En este capítulo solo se analizarán las pruebas de laboratorio que sirven para evaluar la hemostasia de vasos y de plaquetas.

Vasos sanguíneos

Para estudiar los vasos sanguíneos existen diversas pruebas de laboratorio, como la prueba del torniquete, que consiste en poner un torniquete y observar cuántas petequias aparecen en una determinada zona después de cinco minutos de tenerlo apretado.

Otra prueba es la del tiempo de sangrado de Ivy (TS), donde se analiza el tiempo en que se detiene una hemorragia causada por una pequeña lanceta, cuyo tamaño y profundidad se encuentran controlados. Esta prueba también permite evaluar la funcionalidad de las plaquetas.

Plaquetas

Para estudiar las plaquetas, lo más importante es saber primero si su número está dentro de los límites normales. Para esto, se debe hacer un hemograma automatizado y ponerle atención a los índices plaquetarios, los cuales indicarán si las plaquetas son grandes o pequeñas, y si entre ellas hay uniformidad de tamaño.

Para observar la morfología, es importante además realizar un hemograma manual y analizar al microscopio el frotis sanguíneo. Algunos cuadros como el síndrome de Bernard Soulier cursan con plaquetas gigantes, aunque también pueden verse megatrombocitos en casos de hiperplasia megacariocítica por estimulación de la médula ósea.

Lo otro que puede ocurrir es que las plaquetas presenten una funcionalidad alterada. Para esto, es fundamental hacer estudios de glicoproteínas de membrana por medio de anticuerpos monoclonales, los cuales se realizan solo en centros especializados. En Costa Rica lo que se hace es analizar la funcionalidad de las plaquetas por medio del estudio llamado agregación plaquetaria, que requiere de un agregómetro plaquetario y de unos reactivos “agonistas” que promueven la agregación de las plaquetas. Los trastornos plaquetarios denominados cualitativos o funcionales se clasifican dependiendo del agonista que agreguen o no las plaquetas.

Otra prueba que se utiliza para estudiar las plaquetas es el tiempo de cierre, que consiste en observar en cuánto tiempo se cierra un capilar por donde pasa una cantidad de sangre (plaquetas) a una velocidad determinada. Este aparato se denomina PFA 100 y los capilares que se venden están impregnados de colágeno o epinefrina.

CÓMPUTO DE PLAQUETAS

Muestra

Las plaquetas se toman con EDTA y debe ser manipuladas con poca turbulencia, para evitar que se agreguen dentro del tubo.

Principio

Las plaquetas son evaluadas en los hemogramas automatizados, y actualmente, además de contarlas, se consigue ver su tamaño y distribución.

Interpretación

En el paciente que sangra es fundamental conocer si el cómputo de plaquetas es normal (entre 150.000 y 450.000/ μ L) o si es bajo, y si estas tienen tamaño normal (con un volumen medio que oscila entre 7 y 9 fL) o si son grandes.

La disminución del cómputo de plaquetas por debajo de 100.000/ μ L se denomina trombocitopenia y sus causas pueden ser muy variadas. En algunos casos de trombocitopenia, se recomienda hacer un análisis de médula ósea para evaluar el número y productividad de los megacariocitos.

Por el contrario, al conteo alto de plaquetas, por encima de los 450.000/ μ L, se le conoce como trombocitosis y pueden ser primarias, por un trastorno mieloproliferativo, o secundarias, originadas por un gran número de patologías, entre ellas infecciones y enfermedades malignas.

Al momento de realizar los estudios, es importante tener presente que los casos con deficiencias funcionales de las plaquetas producen sangrado con cálculos normales. De igual forma, se debe considerar que algunos pacientes muestran cálculos bajos de plaquetas en el hemograma automatizado por causa de la agregación *in vitro*; en ellos se debe analizar el frotis sanguíneo, para comprobar si el número es normal y si lo que ocurre son grumos plaquetarios.

TIEMPO DE SANGRADO (TS)

Principio

Este método mide el tiempo en que se detiene una hemorragia realizada con una lanceta especial, la cual controla el tamaño y profundidad de la herida (1 cm de largo y 1 mm de profundidad), en condiciones estándar de presión arterial.

Procedimiento

1. Colocar el esfigmomanómetro en el brazo del paciente y mantenerlo a 40 mm de mercurio durante toda la prueba.
2. Hacer una incisión en la cara interna del antebrazo, teniendo cuidado de no dañar venas visibles.
3. Poner a caminar el cronómetro.
4. Recoger la sangre cada 30 segundos con un papel de filtro.
5. Anotar el tiempo en que se detiene la hemorragia.

Notas:

- Esta prueba solo debe realizarse en pacientes que presenten cómputo de plaquetas, TP y TTP normales.
- La prueba debe discontinuarse si se prolonga por más de 15 minutos (el tiempo normal es de menos de ocho minutos).
- Para realizar esta prueba se debe asegurar que la persona no haya ingerido aspirina en la semana previa al análisis.
- En el caso específico de pacientes en los que se sospecha enfermedad de von Willebrand, la prueba puede repetirse a las dos horas posteriores a la ingesta de 0,6 mg de aspirina (en niños usar la mitad de la dosis).

Interpretación

Como se dijo en la introducción, el TS sirve para conocer el estado de los capilares, la elasticidad de la piel y la función de las plaquetas. Asimismo, sirve para evaluar la funcionalidad de los multímeros de alto peso molecular del factor von Willebrand, que son los más activos hemostáticamente hablando.

De igual forma, el análisis periódico del TS es de utilidad para evaluar si los pacientes con enfermedad de von Willebrand a los que se les ha dado desmopresina, corrigen o no el TS. Si se corrige, el paciente será tipo I, y si no llega a corregirse, pertenecería al tipo II.

Cabe mencionar que el TS es una de las técnicas que se realizan con mayor negligencia, dado que muchas

veces se usa una lanceta sencilla, no alcanzándose las condiciones controladas para que el resultado sea reproducible.

Independientemente de cómo se efectúa, esta prueba es muy variable y poco exacta, ya que incluso en un mismo sujeto varía mucho. Además, el TS es un método poco reproducible e invasivo, que deja una marca indeleble, que podría ser una cicatriz queloide (aunque este aspecto varía de paciente a paciente).

En general, en todas aquellas personas que presenten un TS prolongado con un cómputo normal de plaquetas, debe sospecharse una alteración funcional de estas, tanto por causa adquirida (ingesta de aspirina), como por deficiencia hereditaria de alguna de las glicoproteínas plaquetarias de membrana.

En el caso de los hemofílicos, esta prueba siempre resulta normal.

TIEMPO DE CIERRE (PFA 100)

Principio

Esta prueba puede considerarse como un tiempo de sangrado *in vitro*, y tiene la ventaja de ser un método no invasivo y, por lo tanto, no deja marca en el paciente.

La sangre citratada se pasa a través de un capilar a una velocidad fija. Esos capilares pueden ser de dos tipos: unos que poseen colágeno/ADP y otros con colágeno/epinefrina.

La idea es medir el tiempo en que se obstruye el paso de la sangre a través del capilar, debido a la adhesión y agregación de las plaquetas, hasta cerrar la luz del capilar. Esto es inducido sobre todo por la interacción del FvW con las GP Ib y GP IIb/IIIa.

Su aplicación se usa para evaluar pacientes con enfermedad de von Willebrand y con otros problemas de funcionalidad plaquetaria.

Muestra

La muestra usa sangre citratada, la cual se hará pasar a través del aparato en forma íntegra (sangre total), sin necesidad de centrifugar.

Procedimiento

1. Colocar la sangre en la jeringuilla dispensadora y activar el aparato, hasta que este indique que el paso de la sangre se ha detenido.

2. Comparar el tiempo de cierre con los valores de referencia, para saber si el paciente está dentro de los límites normales.
3. Consultar las diferentes posibilidades, para conocer cuál es la alteración del paciente.

Interpretación

Esta prueba sirve para diagnosticar pacientes con enfermedad de von Willebrand y con otros tipos de problemas funcionales de las plaquetas. Sin embargo, aunque la PFA (*platelet function analysis*) dé un resultado normal, para el diagnóstico correcto debe montarse un estudio completo con diferentes pruebas de laboratorio (Figura N° 1).



Figura N° 1. Equipo PFA, mostrando la forma en que se cierran los capilares del aparato.

PRUEBAS DE AGREGACIÓN PLAQUETARIA

Principio

Las pruebas de agregación plaquetaria deben realizarse con plaquetas frescas, las cuales se trabajan inmediatamente después de que la sangre se ha extraído.

Todo el material de extracción debe ser de plástico. Además, la sangre debe manipularse suavemente para no producir espuma en los tubos. Cualquier agitación violenta puede agregar las plaquetas.

La sangre se toma con citrato de sodio y se centrifuga primero a baja velocidad para obtener el plasma rico en plaquetas (PRP). En esos plasmas no es necesario contar el número de plaquetas, pero sí se debe tener en cuenta que en quienes son muy trombocitopénicos, los PRP pueden contener una baja cantidad de plaquetas, por lo que es inadecuado realizar en ellos las pruebas de agregación plaquetaria.

Los pacientes que van a ser estudiados deben evitar ingerir aspirina durante la semana anterior a la prueba, y su cómputo de plaquetas debe ser normal.

Los estudios con agregación plaquetaria incluyen varios agonistas y, dependiendo de la respuesta con cada uno, así será la interpretación de los resultados.

La enfermedad de von Willebrand y el síndrome de Bernard Soulier dan anormal la agregación plaquetaria inducida por ristocetina (RIPA), aunque el subtipo II B de la enfermedad de von Willebrand puede mostrar hiperagregación con este agonista. En ambas enfermedades los otros agonistas presentan resultados normales.

En la trombastenia de Glanzman, la agregación plaquetaria con ADP, colágeno y ácido araquidónico son anormales, mientras que la RIPA es normal.

En la deficiencia del *pool* de depósito, el colágeno es el único agonista que no induce agregación de las plaquetas.

La forma de graficar los resultados de esta prueba se aprecia en la Figura N° 2.

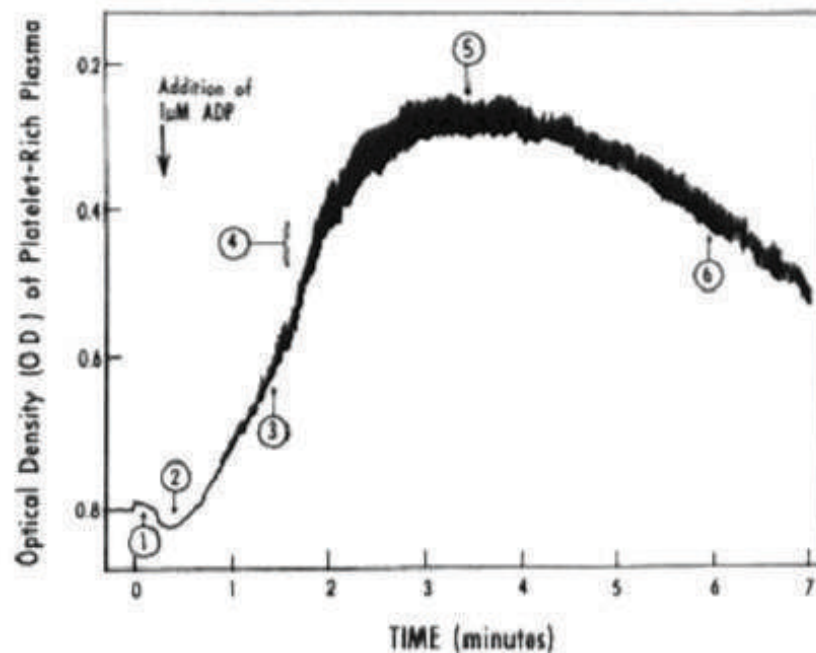


Figura N° 2. Interpretación de los gráficos del agregómetro. En la ilustración se muestran los cambios normales en densidad óptica (OD) producto de la agregación plaquetaria por ADP. Primero ocurre una disminución causada por la dilución del volumen (1). Luego hay un aumento transitorio provocado por el cambio conformacional de las plaquetas (2). Después se produce una disminución progresiva debido a la formación de los agregados plaquetarios (3), hasta que la OD empieza a estabilizarse (4). A partir de ahí se puede calcular el porcentaje máximo de agregación (5). Finalmente, hay una leve disminución en la OD causada por la disgregación que ocurre en algunas condiciones (6).

Muestra

Esta prueba requiere plasma citratado, con manipuleo cuidadoso y centrifugación inmediata.

lágono, ristocetina, ácido araquidónico) y registrar la reacción en el graficador hasta que la curva se aplane.

Notas:

Procedimiento (micrométodo)

1. Centrifugar la sangre citratada a baja velocidad (1.000 rpm) durante 10 minutos y extraer el plasma rico en plaquetas (PRP); ponerlo a agitar suavemente por inversión hasta que se realice la prueba.
2. Posteriormente, se sigue centrifugando el tubo, esta vez a alta velocidad por 20 minutos, para así obtener el plasma pobre en plaquetas (PPP).
3. Añadir 225 μ L de PRP y un imán pequeño a cada uno de cuatro tubos. Luego, colocarlos en el agregómetro, en los canales de incubación correspondientes.
4. Agregar 250 μ L de PPP en un tubo con imán, el cual servirá de blanco. Realizar la lectura del blanco para cada uno de los cuatro canales de lectura. Colocar los tubos con la muestra del paciente que estaba incubándose, en cada uno de los canales de lectura.
5. Adicionar 25 μ L de agonista (ADP, epinefrina, co-

- Cada agonista se agrega en forma individual y se observa su reacción. Dependiendo de los resultados, podría añadirse o disminuirse la concentración del agonista, para ver si las plaquetas presentan estimulación o falta de agregación con esas nuevas concentraciones.
- El uso de algunos medicamentos puede interferir con las pruebas de agregación plaquetaria.

Interpretación

Los niveles normales de agregación con los diferentes agonistas son mayores al 65% de agregación.

Cuando los resultados de las pruebas realizadas se encuentran alterados, se deben consultar las tablas que indican la clase de anomalía que tiene el paciente (Figura N° 3).

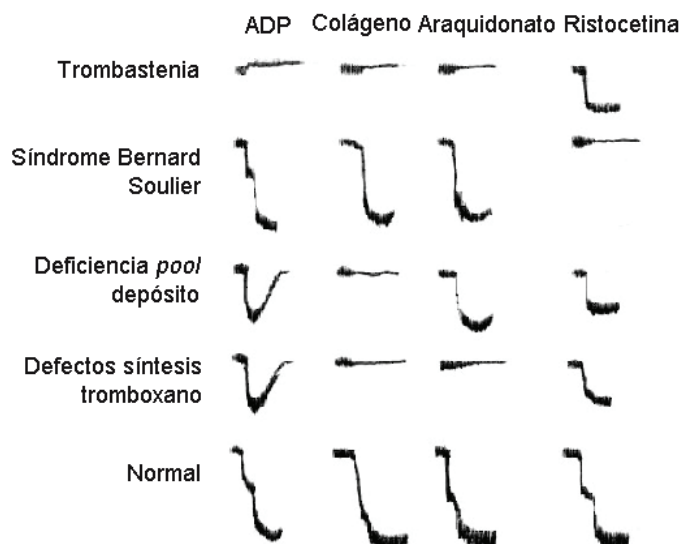


Figura N° 3. Interpretación de las gráficas de agregación plaquetaria utilizando los agonistas plaquetarios más comunes: ADP, colágeno, ácido araquidónico y ristocetina.

De tal forma, con base en los resultados se puede hacer un diagnóstico previo; sin embargo, para realizar el diagnóstico definitivo, es necesario analizar la información obtenida junto con la clínica del paciente y el resto de pruebas de escrutinio, entre ellas el tiempo de sangrado. Lo anterior porque que no se considera fácil el clasificar los problemas funcionales de las plaquetas.

En la Figura N° 4 se muestran las reacciones con cuatro diferentes agonistas.

Los pacientes con enfermedad de Glanzman presentarán anomalía con todos los agonistas, excepto con la ristocetina; mientras que el síndrome de Bernard Soulier y la enfermedad de von Willebrand mostrarán falta de agregación de las plaquetas con ristocetina (RIPA).

COFACTOR DE RISTOCETINA

Principio

La ristocetina es un antibiótico extraído de *Nocardia lurida*, que induce agregación en las plaquetas normales, para lo cual requiere del factor von Willebrand (FvW).

Un aspecto difícil de entender, es que anteriormente se vio que la ristocetina agrega plaquetas frescas en la prueba de (RIPA). Sin embargo, también existe la posibilidad de utilizar plaquetas fijadas y variar solo la cantidad del plasma del paciente en estudio, con el objeto de conocer si este tiene cantidad normal de FvW

(dado que ese factor es indispensable para que ocurra la agregación). Esta prueba se llama cofactor de ristocetina y es diferente de la RIPA.

El cofactor de ristocetina sirve para evaluar la funcionalidad del FvW, ya que esta prueba puede dar anormal si el FvW está disminuido (Tipo 1) o si no funciona adecuadamente por una mutación (Tipo 2).

A pesar de que el cofactor de ristocetina es una prueba para el FvW, que debería describirse en el capítulo de análisis de los factores de la coagulación, se cita aquí porque requiere de un agregómetro plaquetario; pero no debe confundirse con la agregación plaquetaria de plaquetas frescas inducida por ristocetina (RIPA).

Muestra

Esta prueba requiere sangre citratada, la cual puede ser centrifugada y congelada a -70 °C, para hacerse una vez por semana y ahorrar reactivos y tiempo.

Procedimiento

1. Centrifugar la sangre a alta velocidad (2.500 rpm), para obtener un plasma sin plaquetas (PPP).
2. Realizar el blanco mezclando 125 µL de la suspensión de plaquetas liofilizadas y 125 µL de solución salina tamponizada con TRIS.
3. Añadir a cada uno de los tubos del agregómetro 200 µL de la suspensión de plaquetas liofilizadas y 25 µL de ristocetina e incubar por un minuto.
4. Agregar 25 µL de las diluciones correspondientes del plasma del paciente.

5. Previamente, realizar una curva de calibración e incluir en cada corrida un plasma control y uno anormal. En los agregómetros que utilizan *software*, el programa de cómputo calcula de manera automática la funcionalidad del cofactor de ristocetina.

Interpretación

Los valores normales de referencia para el cofactor de ristocetina son superiores al 50%.

Los pacientes con enfermedad de von Willebrand mostrarán niveles bajos de esta prueba, ya sea porque no hay buena cantidad de FvW o porque el FvW no funciona.

Esta prueba debe hacerse siempre en conjunto con el análisis del FvW por un método inmunológico (para medir el nivel real del FvW), sin el cual no podrá diferenciarse si el factor es funcional o afuncional.

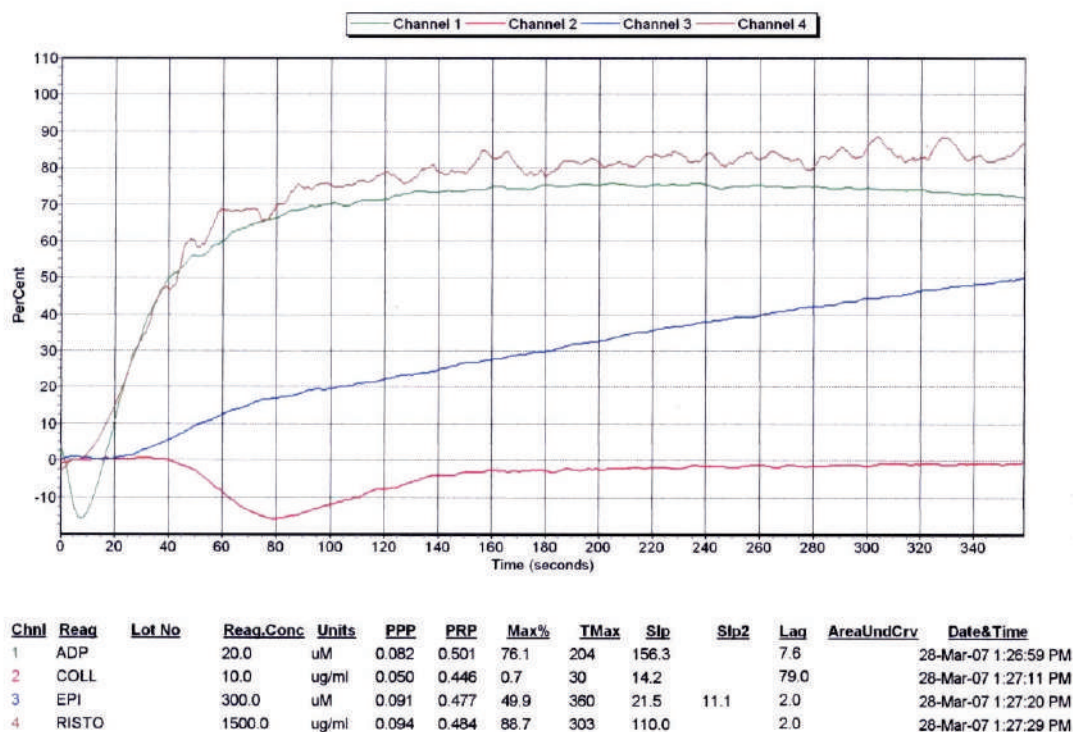


Figura N° 4. Reporte de agregación plaquetaria con cuatro agonistas diferentes. Cada uno de los cuatro canales de lectura del equipo permite evaluar un agonista distinto. En este caso, el canal 1 (línea de color verde) se utilizó para el ADP; el canal 2 (rojo) para el colágeno; el canal 3 (azul) para la epinefrina; y el canal 4 (café) para la ristocetina. Como se observa, con el colágeno no se obtuvo agregación plaquetaria (0,7%); con la epinefrina se obtuvo un 49,9% de agregación; y con el ADP y la ristocetina se alcanzaron valores superiores al 70%. La interpretación de este patrón permite identificar una deficiencia en el *pool* depósito de las plaquetas.

BIBLIOGRAFÍA

Campuzano G. Trombocitopenia: más importante que encontrarla es saber porqué se presenta. *Medicina & Laboratorio* 2007; 13(3-4): 111-152.

Jiménez R, Barrantes A, Mora LA, Flores V, Solano T. Evaluación del tiempo de sangrado por dos métodos diferentes. *Sangre* 1981; 26: 588-594.

Harrison P. The role of PFA-100 testing in the investigation and management of haemostatic defects in children and adults. *Br J Haematol* 2005; 130(1): 3-10.

Rodríguez N, Tordecilla J, Soto V, Joannon P, Campbell M, Rizzardini C. Trombocitosis en la edad pediátrica. *Rev Chil Pediatr* 2000; 71(4): 307-310.

Watson SP, Harrison P. The vascular function of platelets. En: Hoffbrand AV, Catovsky D, Tuddenham E (editores). *Postgraduate haematology*. 5 ed. London: Blackwell; 2005.

DIAGNÓSTICO DE PROBLEMAS DE SANGRADO Y CUANTIFICACIÓN DE FACTORES

Dr. Rafael Jiménez Bonilla

GENERALIDADES

Para iniciar el estudio de cualquier paciente con diátesis hemorrágica, debe tenerse en cuenta el sexo, la edad de las manifestaciones y si se presenta enfermo o sano, dado que los sangrados más comunes son por causas adquiridas.

En el capítulo anterior se habló sobre la forma de abordar los problemas de sangrado, y se hizo hincapié en la importancia de realizar una buena historia clínica para conocer desde cuando comenzó a sangrar la persona y si existen o no antecedentes familiares. Por tanto, en este capítulo solo se analizarán las pruebas que sirven para evaluar las deficiencias de los factores de la coagulación sanguínea.

Al respecto, cabe mencionar que los laboratorios que estudian problemas hemorrágicos deben preparar siempre un plasma normal de referencia, que se obtiene de al menos 20 personas sanas (10 mujeres que no estén ingiriendo anticonceptivos orales y 10 hombres), de quienes se extrae la misma cantidad de plasma; por ejemplo, 500 μ L de cada uno. Esto se conoce como *pool* normal y se considera que tiene el 100% de todos los factores. Este debe mantenerse congelado en pequeñas alícuotas y utilizarse cada vez que se efectúa

una prueba.

Hacer bien el trabajo es vital en los laboratorios para garantizar la precisión de sus resultados; por eso, el control de calidad, visto como un aliado para verificar que las pruebas se realicen correctamente, resulta indispensable en el quehacer profesional de quienes allí laboran.

El control de calidad interno comienza con la obtención de la muestra, lo cual debe realizarse con sumo cuidado, porque una mala toma puede alterar el proceso de coagulación, al activarse o desnaturalizarse los factores y las plaquetas.

En cuanto al análisis de los exámenes de coagulación, es indispensable que todo el material utilizado sea de plástico y que la proporción anticoagulante/sangre sea la adecuada para que las pruebas representen la realidad de lo que ocurre en el paciente.

Asimismo, la sangre citratada tiene que mantener una correcta relación entre el plasma y el anticoagulante, y en el caso de las muestras que posean hematocritos altos o muy bajos, se debe ajustar la concentración del anticoagulante de acuerdo a lo estipulado en el Cuadro N° 1.

Cuadro N° 1. Concentración del citrato de sodio con respecto al nivel de hematocrito

Hematocrito	Anticoagulante	Volumen sangre
25-55%	0,5 ml	4,5 ml
20%	0,7 ml	4,3 ml
60%	0,4 ml	4,6 ml
70%	0,25 ml	4,75 ml
80%	0,2 ml	4,8 ml

Las muestras de coagulación deben realizarse con prontitud (idealmente en las primeras cuatro horas de haberlas tomado), porque de lo contrario, los factores pueden deteriorarse y dar resultados prolongados.

Los lugares que realicen pruebas en forma manual deben tener baños maría con temperaturas bien controladas (37 °C); además, deben cerrar bien el tubo del cloruro de calcio, ya que la solución puede evaporarse y concentrar la cantidad de calcio.

Las determinaciones tienen que montarse por duplicado y cada réplica debe hacerse en un orden balanceado (un paciente tras otro y luego repetirlas en orden inverso, y no las dos determinaciones del paciente seguidas), para comprobar si se produce o no deterioro de los reactivos.

En general, las pruebas siempre deben montarse junto a un control normal y cada laboratorio debe establecer sus propios rangos normales.

En cuanto a aspectos extrínsecos a considerar, se encuentra el hecho de que los pacientes que realizan ejercicio previo a la toma de la muestra, pueden aumentar sus niveles de factor VIII.

TIEMPO DE PROTROMBINA (TP)

Principio

El tiempo en que coagula una mezcla de plasma, tromboplastina tisular y calcio, mide la eficiencia de la vía extrínseca de la coagulación. En caso de que uno o varios de sus factores (I, II, V, VII y X) estén disminuidos, la prueba se prolongará. También si hubiera un inhibidor circulante contra uno de esos factores.

Esta prueba es la más usada en el mundo para controlar la terapia con anticoagulantes orales, y sirve además para evaluar la función hepática, dado que esos factores se producen en el hígado.

Muestras

Plasma citratado.

Procedimiento

1. Agregar 200 µL de tromboplastina más calcio a dos tubos y calentar por 30 segundos a 37 °C.
2. Adicionar 100 µL de plasma.
3. Poner a caminar el cronómetro y anotar el tiempo de coagulación.
4. Repetir el procedimiento con el otro tubo y sacar promedio.
5. Correr siempre un control.

Notas:

- Si el método se realiza de forma manual, es necesario trabajar siempre a 37 °C y tener una buena iluminación para observar correctamente el punto final de la reacción. Si se hace en coagulómetros, se deben revisar las variables del aparato.

- Siempre debe correrse un plasma normal para controlar los reactivos y el equipo. Las indicaciones de la casa productora de la tromboplastina deben seguirse al pie de la letra.
- La forma correcta de reportar los resultados consiste en sacar una relación (razón) entre los segundos de la prueba del paciente y los del control. De esta manera, al elevar esta razón a la potencia del ISI (índice de sensibilidad internacional) de la tromboplastina, se obtiene el INR (*International Normalized Ratio*), que será la forma de controlar a los pacientes que estén recibiendo anticoagulantes orales. Las casas comerciales suministran tablas con los INR para cada uno de los resultados en segundos.
- En todo TP prolongado se debe investigar si la alteración se produjo por una deficiencia, por la mutación de un factor o por la presencia de un anticuerpo circulante. Además, se debe investigar si solo el TP está prolongado o si el TTP también lo está.

TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL (TTP)

Principio

Esta prueba mide la vía extrínseca de la coagulación. A una suspensión de fosfolípidos (tromboplastina parcial), a la cual se le ha añadido un activador de la fase de contacto, se le agrega un plasma en presencia de cloruro de calcio y se mide el tiempo en que coagula la mezcla.

Los activadores más utilizados son: celita, caolín y ácido elágico.

Muestras

Plasma citratado.

Procedimiento

1. Se obtiene un plasma pobre en plaquetas, del cual se añaden 100 µL a un tubo plástico.
2. Añadir 100 µL del reactivo (tromboplastina más activador) y esperar tres minutos (o lo que diga la casa comercial).
3. Agregar 100 µL de cloruro de calcio y cronometrar el tiempo de coagulación.
4. Reportar el tiempo en segundos, haciendo referencia al tiempo del control para ese día.

Interpretación

Un TTP anormal indica ausencia o mutación de uno o

más de los factores involucrados en esa prueba, presencia de heparina en el paciente o contaminación del tubo con heparina.

En esta prueba, además de reportar los segundos del paciente y el rango normal, debe reportarse el tiempo del control, para que el médico interprete los resultados con base en ese dato.

Siempre que se investigue a un paciente con diátesis hemorrágica, el TTP debe hacerse en conjunto con un TP. Si solo el TTP está prolongado, se piensa en una hemofilia (si es varón), en enfermedad de von Willebrand (si es mujer) o en deficiencias adquiridas como el anticoagulante lúpico.

TIEMPO DE TROMBINA (TT)

Principio

El tiempo de trombina (TT) muestra la reacción que se produce entre la trombina y el fibrinógeno.

Específicamente, la prueba consiste en agregar trombina a un plasma, la cual pasará de inmediato el fibrinógeno a fibrina para formar el coágulo *in vitro*.

EL TT debe hacerse cuando se sospeche deficiencia de fibrinógeno o se quieran evaluar los niveles de ese factor, como en una operación de corazón abierto, en donde los cirujanos utilizan heparina (el anticoagulante que neutraliza la trombina).

Muestra

Plasma citratado.

Procedimiento

1. Colocar 200 µL del reactivo (trombina más buffer) en un tubo plástico.
2. Añadir 100 µL de plasma del paciente y cronometrar el tiempo de coagulación.
3. Hacer un TT con plasma control.

Interpretación

Esta prueba se altera si el fibrinógeno se encuentra bajo o hay una mutación de este, en presencia de heparina y cuando hay productos de degradación del fibrinógeno (PDF) grandes (como los X y los Y), debido a que estos productos compiten con la trombina.

Notas:

- En los pacientes con cirugía extracorpórea del corazón, esta prueba debe realizarse en combinación

con un Tiempo de Arvin o de reptilasa, las cuales utilizan venenos de serpiente que convierten el fibrinógeno en fibrina, sin necesidad de la trombina. La acción de esos venenos no es influenciada por el exceso de heparina, y si la prueba da prolongada significa que existe disminución del fibrinógeno.

- Si solo se hiciera un TT y este se encuentra prolongado, siempre habrá duda de si hay disminución del fibrinógeno o presencia de heparina que no fue neutralizada al terminar la operación.
- Las pruebas de Arvin y reptilasa se hacen de la misma manera que el TT, pero en lugar de trombina se usa el veneno de serpiente.
- En cada grupo de prueba deberá incluirse un control de un *pool* de plasma normal.

DETERMINACIÓN DEL FIBRINÓGENO

Principio

El fibrinógeno es la proteína de la coagulación que se encuentra en mayor concentración en el plasma, reportándose sus niveles normales entre 200 y 400 mg/dl.

La deficiencia de fibrinógeno produce diátesis hemorrágica y puede deberse a causas hereditarias o a problemas adquiridos como en la coagulación intravascular diseminada (CID). Algunas mutaciones del fibrinógeno cursan con cuadros trombóticos; por esa razón, la forma de estudiarlo incluye diferentes pruebas, unas funcionales y otras inmunológicas, para conocer si la proteína se encuentra presente a pesar de estar alterada su función.

La trombina convierte al fibrinógeno en un polímero insoluble llamado fibrina. Un método funcional muy utilizado consiste en añadir una concentración fija de trombina al plasma del paciente a diferentes diluciones y plotear los tiempos de coagulación contra las diluciones. El tiempo de coagulación será directamente proporcional a la concentración del fibrinógeno. Este es el método que se describe en el presente apartado.

Muestra

Plasma citratado.

Procedimiento

1. Colocar 200 µL del plasma diluido en tubos plásticos.
2. Añadir 100 µL de trombina y cronometrar el tiempo de coagulación.

3. Hacer una curva de calibración utilizando diferentes diluciones de un plasma normal.
4. Plotear los tiempos de coagulación en segundos contra las diluciones del plasma en papel logarítmico.

Nota:

Los resultados se afectan por la presencia de heparina o de productos de degradación del fibrinógeno (PDF), a no ser que estos últimos estén a niveles inferiores de 100 µg/ml.

PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN DEL FIBRINÓGENO/FIBRINA (PDF)

Principio

Esta determinación mide los productos de degradación del fibrinógeno (PDF) en el suero. Para ello, es necesario coagular la sangre con un exceso de trombina más un inhibidor de la fibrinólisis, para que esta no ocurra *in vitro*. Como los PDF presentan las mismas propiedades antigénicas del fibrinógeno/fibrina, estos productos son detectados con un suero anti-fibrinógeno.

Muestra

Obtener sangre venosa en un tubo plástico que contenga tripsina de frijol de soya, más ácido épsilon-aminocaproico o cualquier inhibidor de la fibrinólisis, y coagularla con trombina bovina. Colocar el tubo a 37 °C para que coagule y centrifugar luego para obtener el suero.

Procedimiento

1. Colocar 750 µL de buffer de glicina a dos tubos plásticos.
2. Añadir cinco gotas de suero del paciente a uno de los tubos (dilución 1:5).
3. Agregar dos gotas del suero del paciente al otro tubo (dilución 1:20).
4. Extraer una gota de cada tubo y colocarla en una lámina de vidrio.
5. Agregar una gota del control positivo y otra del control negativo a la lámina.
6. Poner encima de cada gota una gota del látex anti-fragmentos D y E del fibrinógeno.
7. Mezclar con un aplicador y rotar manualmente la lámina hasta que el control positivo muestre grumos pequeños.

Interpretación

Esta prueba presenta una sensibilidad de 2 µg/ml, por lo que una aglutinación en cualquiera de las dos diluciones del paciente indica presencia de PDF. Una aglutinación en la dilución 1:5 demuestra que el paciente tiene más de 10 µg/ml de PDF; mientras que una aglutinación en la 1:20 indica una concentración superior a 40 µg/ml.

Esta prueba también puede realizarse en orina, filtrando y centrifugando la muestra. En este caso las diluciones que se hacen pueden variar, dependiendo de lo que se sospeche. En caso de sepsis urinaria pueden presentarse falsos positivos.

Nota:

Si se presenta aglutinación en la dilución 1:20 y no en la 1:5, la prueba deberá repetirse.

CUANTIFICACIÓN DE FACTORES**Principio**

La cuantificación de cualquier factor de la coagulación sanguínea usa el mismo principio: hacer un TP o un TTP (dependiendo del factor que va a cuantificarse) y añadir al sistema un plasma deficiente en el factor que va a medirse, con el fin de que la única cantidad que exista de ese factor sea la que está en el plasma del paciente.

La prueba debe hacerse con un plasma normal (*pool*), al que se le da arbitrariamente un valor del 100% de ese factor.

Muestra

Plasma citratado.

Procedimiento

1. Hacer un TP o un TTP, dependiendo del factor que se desea cuantificar.
2. Añadir 100 µL de plasma deficiente del factor a cada tubo.
3. Hacer una curva de calibración con diferentes diluciones del plasma normal.
4. Graficar los resultados de las pruebas versus la concentración del factor.

Nota:

El rango normal de los factores de la coagulación oscila entre el 50-150% de factor.

CUANTIFICACIÓN DE INHIBIDORES DEL FACTOR VIII

Principio

Los hemofílicos severos que reciben un tratamiento prolongado con factor VIII, pueden producir anticuerpos dirigidos contra este factor, los cuales son conocidos como inhibidores.

Si se añade factor VIII a un plasma que tenga un inhibidor y se incuba la mezcla, el factor VIII será neutralizado progresivamente. Si se estandarizan la cantidad de factor VIII y el período de incubación, podrá definirse la potencia del inhibidor por medio de unidades (Bethesda), de acuerdo a la cantidad del factor VIII que fue neutralizado.

La prueba se puede hacer utilizando factor VIII humano o porcino y se denomina Ensayo de Bethesda.

Esta prueba debe realizarse en los hemofílicos que comienzan a responder mal al tratamiento con factor VIII.

Muestra

Plasma citratado.

Procedimiento

1. Preparar diluciones dobles del plasma del paciente (1:2, 1:4, etc.) en tubos plásticos.
2. Pipetear 200 μ L de plasma deficiente en factor VIII en otro tubo de plástico (estándar de 100%).
3. Añadir 200 μ L del *pool* normal, tanto al tubo estándar como a las diluciones del plasma del paciente.
4. Mezclar los tubos e incubarlos a 37 °C durante dos horas.
5. Después de las dos horas de incubación, hacer una cuantificación de factor VIII a cada tubo.

Interpretación

En un papel logarítmico, realizar un gráfico del porcentaje de factor VIII residual frente a las unidades del inhibidor y definir las unidades Bethesda que tiene el paciente.

INVESTIGACIÓN DEL FACTOR XIII

Principio

El factor XIII estabiliza el entrecruzamiento de la fibrina y hace que el coágulo se vuelva estable. Para ello requiere trombina y calcio.

En los plasmas citratados normalmente queda una cantidad de calcio residual, suficiente para hacer que el coágulo se forme en presencia de trombina.

Como control positivo puede usarse plasma tomado con EDTA, en el cual no queda nada de calcio.

Muestra

Plasma citratado.

Procedimiento

1. Colocar 200 μ L de plasma citratado y 200 μ L de suero salino fisiológico en un tubo.
2. Añadir 100 μ L de trombina (30 U/ml) al tubo y mezclar.
3. Dejar 30 minutos a 37 °C.
4. Sacudir levemente el tubo para separar el coágulo de la pared de este.
5. Añadir 5 ml de ácido acético al 2% y tapar el tubo.
6. Dejar el tubo a temperatura ambiente durante 12 horas, al cabo de las cuales debe observarse si el coágulo está presente o si fue deshecho.

Interpretación

El plasma con EDTA (control positivo) nunca debe tener un coágulo después de la incubación; en cambio, un plasma normal debe tener un coágulo íntegro y visible.

Si un paciente no muestra coágulo, debe sospecharse deficiencia de factor XIII.

Nota:

Recordar que los pacientes con deficiencia de factor XIII presentan TP y TTP normales.

INVESTIGACIÓN DE ANTICOAGULANTE LÚPICO

Principio

Para los laboratorios que investigan alteraciones hemorrágicas, es importante identificar los casos que presentan TTPs prolongados debido a la presencia de anticuerpos antifosfolípidos, como el anticoagulante lúpico (AL).

El AL reacciona contra proteínas compuestas o ligadas con los fosfolípidos cargados negativamente; sin embargo, otros anticuerpos pueden estar dirigidos contra la protrombina. Lo relevante de diagnosticarlos en el laboratorio es que, a pesar de que pueden prolongar el TTP y algunas veces el TP, esos anticuerpos no producen sangrado, sino problemas tromboticos.

No todos los reactivos utilizados en el TTP son sensibles al AL, y se recomienda montar más de una prueba con diferentes reactivos para poder detectarlo.

Los criterios para diagnosticar un AL son los siguientes: prolongación de una prueba fosfolípido dependiente, evidencia de un inhibidor (demostrado por estudios de mezcla de plasmas), confirmación de la naturaleza fosfolípido-dependiente del inhibidor y ausencia de inhibición específica contra un factor de la coagulación (VIII o IX, por ejemplo).

Muestra

Plasma citratado.

Procedimiento

1. Centrifugar la sangre dos veces a alta velocidad para eliminar cualquier traza de plaquetas residuales.
2. Realizar un TTP.
3. En caso de dar prolongado, hacer pruebas específicas, como la determinación con veneno de víbora de Russell o el tiempo de coagulación de caolín (método de Exner), las cuales no se detallan, porque solo se realizan en laboratorios muy especializados.

Nota:

La interpretación de estas pruebas requiere diferenciar entre la presencia de un AL, la deficiencia de un factor de la coagulación y la presencia de heparina.

BIBLIOGRAFÍA

Brozovic M, Mackie IH. Investigation of a bleeding tendency. En: Dacie JV, Lewis SM. Practical haematology. 7 ed. Edinburgh, Scotland: Churchill Livingstone; 1994.

Chanarin I. Laboratory Haematology: an account of laboratory techniques. Edinburgh, Scotland: Churchill Livingstone; 1989.

Exner T, Richard KA, Kronenberg HA. A sensitive test demonstrating lupus anticoagulant and its behavioural patterns. Brit J Haematol 1978; 40(1): 143-151.

Kitchen S, McGraw A. Diagnóstico de la hemofilia y otros trastornos de la coagulación: manual de laboratorio. Montreal, Canadá: Federación Mundial de Hemofilia; 2002.

Kitchen S, McGraw A, Echenagucia M. Diagnóstico de la hemofilia y otros trastornos de la coagulación: manual de laboratorio. 2 ed. Montreal, Canadá: Federación Mundial de Hemofilia, 2010.

Verbruggen B, Novakova I, Wessels H, Boezeman J, van den Berg M, Mauser-Bunschoten E. The Nijmegen modification of the Bethesda assay for factor VIII: C inhibitors: improved specificity and reliability. Thromb Haemost 1995; 73(2): 247-251.

DETECCIÓN DE TROMBOFILIA HEREDITARIA Y CONTROL DE LA ANTICOAGULACIÓN

*Dr. Rafael Jiménez Bonilla
Dra. Lidiette Salazar Palma
Dr. Walter Cartín Sánchez*

GENERALIDADES

Todo laboratorio de coagulación debe tener pruebas para el diagnóstico de problemas de sangrado y de trombosis. En este sentido, cabe mencionar que a lo largo de los años, los estudios de coagulación han sido bien estandarizados para diátesis hemorrágicas; sin embargo, en los casos de trombofilia el asunto ha sido más complicado, porque no existen pruebas de laboratorio que puedan predecir si una persona desarrollará o no un trastorno vaso-oclusivo.

Aunado a lo anterior, el manejo médico de los problemas tromboticos se realiza con anticoagulantes y trombolíticos, y en trombosis arteriales también con antiagregantes plaquetarios. Eso implica que el paciente podría sangrar por exceso de anticoagulantes o recaer de su problema trombotico si no se encuentra bien anticoagulado.

Es importante recordar que la trombofilia solo debe ser estudiada exhaustivamente cuando hay trombosis atípicas, espontáneas, a repetición, en pacientes menores de 45 años o de mayor edad que tienen en su historial un evento trombotico temprano no estudiado, haciendo énfasis en la necesidad de hacer una investigación adecuada, que incluya pruebas de laboratorio para trombosis y análisis del frotis sanguíneo, así como métodos de imagen no invasivos.

En el presente capítulo solo se describirán pruebas de coagulación utilizadas para investigar trombofilia y la que sirve para monitorear la heparina de bajo peso molecular, ya que las otras fueron descritas en capítulos anteriores de este libro.

Como los antiagregantes plaquetarios y trombolíticos no requieren normalmente control de laboratorio, tampoco se señalan aquí ninguno de esos métodos. En caso necesario, deberían realizarse las pruebas de rutina para investigar diátesis hemorrágica.

INVESTIGACIÓN DE TROMBOSIS VENOSA PROFUNDA

Las trombosis venosas profundas (TVP) son produ-

cidas por estímulo del mecanismo de la coagulación. Para su investigación, lo más importante es investigar inhibidores, porque si están disminuidos podrían ser capaces de desarrollar TVP.

Por frecuencia poblacional, lo primero que debe estudiarse es la presencia de factor V Leiden y posteriormente otras proteínas, recordando que todas las trombosis se producen por múltiples causas.

FACTOR V LEIDEN

Este estudio se realiza por métodos de coagulación o por biología molecular en laboratorios muy especializados.

Principio

El factor V Leiden es una mutación del factor V normal. Quienes lo presentan tienen mayor susceptibilidad a presentar TVP, pues ese factor mutado activo no responde igual al sistema de inactivación de la proteína C-S.

Es importante hacer primero las pruebas de escrutinio y luego las de biología molecular (para definir si el paciente es homocigoto o heterocigoto). Lo que trata de conocerse es si el paciente presenta resistencia a la proteína C activada, lo cual prolonga el TTP.

Muestra

Plasma citratado.

Procedimiento

1. Colocar 20 µL en cada uno de dos tubos plásticos.
2. Agregar a cada uno 80 µL de plasma deficiente en factor V.
3. Al tubo 1 se le agregan 100 µL de reactivo activador y al 2, 100 µL de solución tampón.
4. Añadir 100 µL de reactivo de TTP (específico de la prueba) a ambos tubos.
5. Incubar los tubos tres minutos a 37 °C.
6. Adicionar a cada uno 100 µL de cloruro de calcio y cronometrar los tiempos de coagulación.

Notas:

- Para garantizar la comparación de resultados (distintos aparatos dan resultados diferentes) se recomienda calcular el radio normalizado (NR), obtenido de las indicaciones de las casas comerciales. El valor de sensibilidad específico (anotado por el fabricante) debe determinarse mensualmente para cada aparato y lote de reactivos.
- Los valores de referencia en este procedimiento se estiman en menos de 120 segundos. Tomando el resultado expresado como NR, este es mayor de 0,8. A partir de aquí se interpreta: de 0,7 a 0,8 resistencia leve; de 0,4 a 0,69 resistencia moderada; y de 0,4 o menos resistencia marcada.

ANTITROMBINA**Principio**

La antitrombina (AT) neutraliza la trombina y al factor Xa predominantemente y utiliza la heparina como su cofactor. La AT puede medirse por métodos inmunológicos o coagulométricos, y en los laboratorios especializados deben utilizarse ambos métodos para poder clasificar sus variantes. Su deficiencia es capaz de producir trombosis en combinación con otros factores de riesgo.

El método que se describe aquí es cromogénico y consiste en agregar un exceso de heparina. Después de neutralizar la trombina, el remanente de ella es catalizado por la liberación de paranitroanilina de un sustrato cromogénico. La reacción se detiene con ácido acético y se lee en un espectrofotómetro.

Los métodos cromogénicos son muy ingeniosos y han revolucionado los estudios de coagulación; también existen métodos inmunológicos que miden el nivel de la proteína, pero no su funcionalidad.

Muestra

Plasma citratado.

Procedimiento

1. Preparar una curva de calibración con base en un *pool* de plasmas normales. La dilución 1:30 representa el 100% y la 1:60 el 50%.
2. Colocar 200 µL de plasma a un tubo plástico.
3. Incubar 2-4 minutos a 37 °C.
4. Añadir 200 µL del reactivo 1 (heparina/trombina).
5. Incubar 60 segundos.
6. Agregar 200 µL del reactivo cromogénico.
7. Incubar 60 segundos.

8. Añadir 200 µL de ácido acético al 50% y agitar.
9. Leer a 405 nm contra un blanco de todos los reactivos, pero sin incubación.

Nota:

Los valores normales oscilan entre 80% y 120%.

PROTEÍNA C**Principio**

El método cromogénico valora la funcionalidad de la proteína C, para lo cual esta proteína es activada específicamente por un derivado del veneno de *Agkistrodom contortrix*. La cantidad de enzima producida se mide por la actividad amidásica con un sustrato cromogénico específico, y la paranitroanilina formada se lee en un espectrofotómetro, donde el color será proporcional al nivel plasmático de la proteína C. Su deficiencia adquirida o hereditaria podría producir trombosis.

También existen métodos inmunológicos que miden el nivel de la proteína, pero no su funcionalidad.

Muestra

Plasma citratado.

Procedimiento

1. Pipetear 200 µL de plasma (normal y del paciente) a los pozos respectivos.
2. Incubar dos horas a temperatura ambiente.
3. Lavar cinco veces.
4. Añadir 200 µL del inmunoconjugado a cada pozo.
5. Cubrir los pozos e incubar dos horas a temperatura ambiente.
6. Lavar cinco veces.
7. Agregar 200 µL del revelador de color.
8. Incubar por tres minutos a temperatura ambiente.
9. Añadir 50 µL de ácido sulfúrico 3 M y esperar 10 minutos.
10. Medir la absorbancia a 492 nm.

Nota:

Niveles normales de 70% a 130%.

PROTEÍNA S**Principio**

La proteína S es un cofactor de la proteína C; su determinación es importante porque su deficiencia podría causar problemas trombóticos.

Los métodos que evalúan esta proteína deben incluir pruebas en donde se mida la cantidad total y la fracción libre, ya que esta última es la funcionalmente activa.

Muestra

Plasma citratado.

Procedimiento

1. Hacer un estándar con un *pool* de plasmas normales y considerar la dilución 1:10 como 100%, la dilución 1:15 como 75% y la 1:20 como 50%.
2. El método mide el punto final a temperatura ambiente (18-25 °C). Es necesario comprobar que el reactivo se encuentra a esa temperatura.

En un tubo plástico:

Plasma (patrón o enfermo)	50 µL
Añadir el reactivo 1 poniendo en marcha el cronómetro al mismo tiempo	500 µL
Mezclar y esperar exactamente	20 minutos

Medir la absorbancia a 590 nm.

Nota:

Valores normales de 70% a 140%.

DÍMERO D

Principio

El dímero D es un producto de degradación de la fibrina y se produce siempre que hay coagulación intravascular. La prueba tiene excelente sensibilidad para detectar TVP, ya que casi el 100% de los pacientes que presentan TVP la dan positiva.

En presencia del antígeno correspondiente, las partículas de látex sensibilizadas por el anticuerpo monoclonal forman agregados macroscópicos, si la concentración del dímero D es igual o superior a 0,5 µg/ml (expresada en equivalente de fibrinógeno inicial).

Muestra

Plasma citratado.

Procedimiento

1. Colocar 20 µL de plasma en una placa y montar controles positivos y negativos.
2. Añadir 20 µL de suspensión de látex anti-dímero D.

3. Mezclar y observar hasta 180 segundos.
4. Si la prueba es positiva deben prepararse diluciones seriadas y montar nuevamente cada dilución con la suspensión reactiva. El resultado final corresponde a la última dilución que aglutina. Para expresar el resultado en µg/ml se multiplica ese factor de dilución por 0,5.

ANTI-FACTOR Xa

Principio

La heparina inhibe la trombina y al factor Xa mediante el complejo antitrombina-heparina. La heparina de bajo peso molecular debe controlarse por medio de la actividad del factor Xa; sin embargo, cuando está sin fraccionar, la prueba recomendada es el TTP.

Esta prueba mide el factor Xa residual después de coagular la muestra con calcio y fosfolípidos, en presencia de un plasma sustrato que contenga todos los factores de la coagulación y suficiente cantidad de antitrombina.

Muestra

Plasma citratado.

Tomar la muestra cuatro horas exactas después de la inyección subcutánea de heparina de bajo peso molecular.

Procedimiento

1. Precalentar los tubos a 37 °C al menos por tres minutos y agregarle a cada uno una bolita de plástico.
2. Añadir 25 µL de plasma (control y paciente) a cada tubo.
3. Agregar 100 µL de plasma sustrato a cada uno y mezclar.
4. Incubar durante 60 segundos.
5. Añadir 100 µL de factor Xa y mezclar.
6. Agregar 100 µL de fosfolípidos más calcio y cronometrar.

Nota:

Los valores de anticoagulación profiláctica oscilan entre 0,1-0,3 U/ml y la anticoagulación terapéutica es de 0,5-1,0 U/ml.

CONTROL DE LA TERAPIA ANTICOAGULANTE

La primera complicación de esta terapia es el sangrado por exceso de medicación; de ahí que el control de laboratorio sea fundamental para evitar que los pacientes sangren y para asegurar que la dosis suministrada

es suficiente para resolver el problema trombótico.

Como se mencionó en el capítulo de trombosis, existen diversos tipos de anticoagulantes y pruebas de laboratorio, entre las cuales la más utilizada para el seguimiento de los anticoagulantes orales es el tiempo de protrombina (TP), y para la heparina convencional el tiempo de tromboplastina parcial (TTP).

En el caso de la heparina de bajo peso molecular, es importante indicar que solo requiere control de laboratorio en casos muy concretos, como en niños, personas obesas o mujeres embarazadas.

BIBLIOGRAFÍA

Brozovic M, Mackie IH. Investigation of a bleeding tendency. En: Dacie JV, Lewis SM. Practical haematology. 7 ed. Edinburgh, Scotland: Churchill Livingstone; 1994.

Chanarin I. Laboratory Haematology: an account of laboratory techniques. Edinburgh, Scotland: Churchill Livingstone; 1989.

Exner T, Rickard KA, Kronenberg HA. A sensitive test demonstrating lupus anticoagulant and its behavioural patterns. Brit J Haematol 1978; 40(1): 143-151.

Fernández A, Vidal R. Utilidad del dímero-D en el diagnóstico del tromboembolismo pulmonar en urgencias. An Med Interna (Madrid) 2002; 19(12): 58-59.

Juhan-Vague I, Aillaud MF, Riera H y Martinoli JL. Dosage de l'activité anti-Xa de l'héparine. Feuil Biol 1981; 22: 33-37.

Kitchen S, McGraw A. Diagnóstico de la hemofilia y otros trastornos de la coagulación; manual de laboratorio. Montreal, Canadá: Federación Mundial de Hemofilia; 2002.

Verbruggen B, Novakova I, Wessels H, Boezeman J, van den Berg M, Mauser-Bunschoten E. The Nijmegen modification of the Bethesda assay for factor VIII: C inhibitors: improved specificity and reliability. Thromb Haemost 1995; 73(2): 247-251.

PRUEBAS DE LABORATORIO PARA EL DIAGNÓSTICO DE PORFIRIAS

Dr. Luis A. Mora Bermúdez
Dr. Luis F. Rojas Solano

GENERALIDADES

Las porfirias (del griego *porphuros*, que significa púrpura) son un grupo de trastornos hereditarios o adquiridos, que afectan el metabolismo del hem, dando como resultado la secreción excesiva de porfirinas y precursores de estas.

Existen siete tipos de porfirias, y cada uno de ellos deriva de un defecto en una enzima específica del ciclo de formación del hem. De acuerdo al tipo, las personas pueden presentar manifestaciones dermatológicas o las llamadas crisis “abdominopsiconeurológicas”, que incluyen desde un fuerte dolor abdominal, hasta vómito, irritabilidad, entre otros.

Paciente con síntomas dermatológicos (porfiria cutánea)

Las lesiones cutáneas son causadas por fotosensibilización de la piel por las porfirinas, las cuales siempre se presentan con una sobreproducción. Con este tipo de sintomatología se presentan la protoporfiriaeritropoyética o eritrohepática (PPE), la porfiriaeritropoyética (PE) y la porfiria cutánea tardía o tarda (PCT). Los pacientes con PPE usualmente presentan en la niñez fotosensibilidad aguda, pero esta no se acompaña de fragilidad de la piel o bulas. Las otras formas de porfiria cutánea (porfiriabulosa) presentan fragilidad de la piel, bulas y otras lesiones en las zonas expuestas al sol.

Un caso sospechoso de PPE se puede confirmar o excluir por medición de la protoporfirina libre eritrocitaria, siempre y cuando se utilice un método que permita diferenciar entre protoporfirina libre y protoporfirina ligada al zinc. Para los casos sospechosos de porfiriabulosa se requiere un examen de orina y de heces o de plasma, en busca de exceso de porfirinas. El de plasma es un sustituto adecuado del de heces y es particularmente importante para diferenciar a la porfiria mixta o variada (PV) de las otras formas de porfiriabulosa, de las cuales la porfiria cutánea tardía es, sin lugar a dudas, la más común.

ANÁLISIS CUALITATIVO DE UNA MUESTRA FRESCA DE ORINA

Objetivo

Determinar si hay aumento en la concentración de PBG (porfobilinógeno).

Fundamento

El PBG reacciona con el p-dimetilaminobenzaldehído (uno de los llamados reactivos de Ehrlich) en medio ácido y forma un derivado de condensación de color rojo, cuyo espectro de absorción presenta un valor máximo en 553 nm.

Método

Reacción de Watson-Schwartz, basada en la formación de un complejo.

Interpretación

- **Resultado negativo:** descartar el diagnóstico de porfiria aguda intermitente (PAI).
- **Resultado positivo:** si la fase acuosa aparece de color rosado, eso significa que hay PBG en la muestra. En este caso, se recomienda cuantificar el PBG, preferiblemente en la misma muestra de orina, porque pueden ocurrir falsos positivos. La cuantificación se puede hacer por cromatografía de intercambio iónico u otra técnica adecuada, que permita la separación del PBG, para luego proceder a su análisis por técnicas espectrofotométricas.

PRUEBA DE WATSON-SCHWARTZ

Reactivos

1. Reactivo de Ehrlich: se disuelven 0,7 g de p-dimetilaminobenzaldehído en 150 ml de HCl concentrado y se añaden luego 100 ml de agua destilada.
2. Solución saturada de acetato de sodio.
3. Cloroformo.

Procedimiento

Se mezclan partes iguales de orina y reactivo de Ehrlich. Se añade luego un volumen igual de solución saturada de acetato de sodio. Posteriormente, se agregan unos mililitros de cloroformo y se mezcla completamente por agitación. El derivado formado por el porfobilinógeno permanece en la fase acuosa (la superior), mientras que el formado por el urobilinógeno (si hay) es extraído por el cloroformo (fase inferior).

Comentarios

1. Otras sustancias presentes en la orina pueden reaccionar con el reactivo de Ehrlich y dar derivados de color rojo, principalmente el urobilinógeno, o pueden inhibir la reacción. Todas estas tienen que ser eliminadas.
2. Algunos métodos en los cuales el complejo de PBG-Ehrlich se separa del complejo urobilinógeno-Ehrlich han sido criticados por su baja sensibilidad y su pobre especificidad.
3. Las muestras que den resultado positivo por métodos cualitativos o semicuantitativos deben ser confirmadas por un método específico, cuantitativo, para lo cual debe usarse preferiblemente la misma muestra de orina. Existen equipos comerciales que utilizan pequeñas columnas de cromatografía de intercambio iónico (BioRad), los cuales incrementan la utilidad de la prueba de Watson-Schwartz.
4. El límite de detección de PBG con los métodos cualitativos o semicuantitativos es de 25 a 50 umoles/litro. La mayoría de los pacientes con ataques agudos de porfiria excretan cantidades mayores y deben dar resultados positivos.
5. La excreción de PBG disminuye a medida que el ataque declina; sin embargo, usualmente permanece elevada por varias semanas, por lo menos en la PAI. En la porfiria variada (PV) y en la coproporfiria hereditaria (CPH), la excreción puede retornar a valores normales en una semana, más o menos, después de que se establece el ataque.
6. Si las pruebas presuntivas son negativas y se mantiene la sospecha clínica de que el paciente tiene porfiria aguda, se hace necesario determinar las concentraciones urinarias de PBG y de δ -ALA. Por otra parte, es importante realizar una prueba de fluorescencia plasmática para porfirinas y si esta descarta la PV, hacer la determinación en las heces. Si todas estas investigaciones dan negativas, entonces se puede descartar la porfiria aguda como causante de los síntomas.

PRUEBA DE HOESCH PARA EL ESTUDIO DE PACIENTES CON PORFIRIA AGUDA

El diagnóstico de la PAI y de los ataques agudos de PV y de CPH, se basa en la demostración de una excreción urinaria aumentada de PBG. Con esta finalidad, se ha utilizado a través de los años la prueba desarrollada por Watson y Schwartz en 1941 y modificada en 1964.

Empleándose el mismo reactivo, originalmente descrito por Pröscher en 1900, la prueba de Hoesch ha sido considerada como más simple y más fácil de interpretar que la prueba de los autores antes mencionados.

Reactivos

1. Reactivo de Ehrlich: 20 g de p-dimetilaminobenzaldehído se disuelven en 1.000 ml de HCl 6N. Este reactivo puede ser conservado por lo menos durante nueve meses en un frasco de vidrio claro en el estante del laboratorio, sin pérdida aparente de actividad.

Procedimiento

En un tubo de ensayos se colocan unos 2-3 ml del reactivo de Ehrlich, a los que se añaden dos gotas de orina fresca.

Resultado positivo

Instantáneamente aparece un color rojo-cereza, ubicado en un inicio en la parte superior de la solución, pero que se extiende por toda esta si se agita el tubo levemente.

Comentarios

1. En investigaciones realizadas por Lamon, With y Redeker, se encontró que la prueba de Watson-Schwartz y la de Hoesch dan resultados idénticos en personas sanas y en casos documentados de PAI y de PV.
2. Dos casos de enfermedad hepática con pruebas positivas para urobilinógeno, dieron positiva la prueba de Watson-Schwartz, mientras que la de Hoesch no era reactiva.
3. En 1970, With estudió 50 pacientes que presentaban problemas abdominales agudos, con diagnósticos diferentes a porfiria, que dieron prueba de Hoesch negativa. Tiempo después, Doss reportó pruebas de Hoesch negativas en 300 pacientes con desórdenes hepáticos crónicos, porfiria cutánea tardía, intoxicación con plomo y polineuritis.

4. Durante los ataques de porfiria aguda intermitente, la concentración de PBG en el suero puede ser igual a 10 mg/l o mayor. Por esto, es importante contar con una prueba que sea inequívocamente positiva a estas concentraciones, pero que no sea muy sensible como para detectar concentraciones fisiológicas de este precursor de porfirinas.
5. Aunque se trata de enfermedades poco frecuentes, tanto la PAI como la PV deben tomarse en cuenta cuando se trata de efectuar un diagnóstico diferencial de un paciente con desórdenes abdominales dolorosos y con ciertos problemas neurológicos.
6. Falsos negativos ocasionalmente han representado un problema para la prueba de Watson-Schwartz y la de Hoesch.
7. La prueba de Hoesch no detecta las bajas concentraciones de PBG que se encuentran en la orina de personas sanas. Su valor descansa en el poder de tamizaje en pacientes con supuestos ataques agudos de porfiria. En estos casos, la concentración de PBG en la orina es típicamente superior a 10 mg/l. Aquí es donde la prueba de Hoesch es inequívoca.
8. Se han reportado casos de pruebas sospechosas de Watson-Schwartz que fueron encontradas negativas con métodos cuantitativos.

ANÁLISIS CUALITATIVO DE UNA MUESTRA DE SANGRE

Objetivo

Determinar si en la sangre hay cantidades excesivas de porfirinas.

Método

Puede efectuarse la prueba de Heller, que consiste en la extracción de la protoporfirina libre con disolventes orgánicos, seguida de análisis espectrofotométrico.

Resultado positivo

Si la protoporfirina libre se encuentra aumentada, el diagnóstico es de PPE.

MÉTODO DE RIMINGTON Y CRIPPS

Reactivos

- Mezcla de éter etílico-ácido acético glacial 5:1
- Solución de HCl 3N

Procedimiento

A 2,5 ml de la mezcla de éter y ácido se le agregan dos gotas (0,1 ml) de sangre. Se agita la mezcla con una varilla de vidrio. Se decanta luego el líquido sobrenadante en un tubo de ensayo; se añaden 0,5 ml de la solución de HCl, se cierra el tubo y se agita bien. Se observa bajo iluminación con luz ultravioleta.

Resultado

Cuando se trabaja con sangre de una persona sana, la fluorescencia roja típica de las porfirinas aparece en la capa inferior, en forma tenue o incluso puede que no aparezca. Cuando la sangre contiene grandes cantidades de coproporfirina o de protoporfirina, se presenta una fluorescencia roja muy intensa.

ANÁLISIS CUALITATIVO DE UNA MUESTRA DE ORINA

Objetivo

Determinar si la excreción de porfirinas se encuentra aumentada.

Método

Prueba de UIT, que consiste en la extracción de las porfirinas de una muestra de orina con una mezcla de disolventes orgánicos, para luego iluminar la muestra con luz ultravioleta.

Resultado positivo

Este hallazgo establece la necesidad de efectuar una investigación posterior para identificar las porfirinas individuales y para distinguir entre una coproporfirinuria secundaria y una porfiria.

PRUEBA DE LEE

Reactivos

Mezcla de extracción: volúmenes iguales de éter etílico, ácido acético glacial y alcohol amílico.

Procedimiento

Se colocan en un tubo de ensayo 10 ml de orina y 1 ml de la mezcla de extracción. Se agita vigorosamente el contenido del tubo por unos 20 segundos y se deja en reposo para que ocurra la separación de las fases. Se examina luego con una lámpara de luz ultravioleta.

Resultado

Si se observa fluorescencia roja o anaranjada en la capa orgánica superior, la prueba es positiva.

Comentarios

1. El límite de detección de porfirinas depende de la magnitud de la absorbancia del medio; sin embargo, en una orina de color normal deberían detectarse concentraciones aproximadas de 50 nm/litro.
2. Las porfirinas son fuertemente adsorbidas por el fosfato de calcio y otros precipitados que se pueden formar en la orina. Por esto, es importante no descartar los precipitados antes de la adición de HCl.
3. La causa más común de un aumento de las porfirinas en la orina es la coproporfinuria secundaria a disfunción hepática, el alcoholismo, la ingesta de algunas drogas y la intoxicación con plomo.
4. La coproporfinuria secundaria no se asocia normalmente con otras anomalías del metabolismo de los precursores del hem. Una excepción es la intoxicación con plomo, en la cual la concentración urinaria de δ -ALA y la protoporfirina eritrocítica unida a zinc (PE-Zn) (Capítulo 42) aumentan.
5. En condiciones normales, la orina contiene más coproporfirina que uroporfirina. Es posible, entonces, que la concentración de uroporfirina y de otros derivados sustitutos del ácido acético sean anormales, aunque la cantidad total de porfirinas sea normal, particularmente en pacientes de PCT que se encaminan a un estado de remisión de síntomas.

BIBLIOGRAFÍA

Batista I, Rago M. Porfiria: presentación de dos casos de porfiria aguda intermitente en emergencia y revisión del tema. *Biomedicina* 2011; 6(3): 6-18.

Lamon J, With TK, Redeker AG. The Hoesch test: bedside screening for urinary porphobilinogen in patients with suspected porphyria. *Clin Chem* 1974; 20(11): 1438-1440.

Medina E, Carbajal B, Ponce C, Sandoval N, Valladares E. Las porfirias. *Rev Med Hond* 2000; 68: 16-24.

With TK. A short history of porphyrins and the porphyrias. *Int J Biochem* 1980; 11(3-4): 189-200.

With TK. Diagnostic tests for porphyria. *Laboratory Medicine* 1980; 11(7): 446-454.

ÍNDICE ALFABÉTICO ANALÍTICO

A

- Acantocitosis 111
- Ácido peryódico de Schiff (PAS), reacción 622, 624
- Ácido transretinoico (ATRA) 419, 424
- Actividad enzimática de G-6PD y PK 113-121, 557-558
- Adenopatías 205, 227-241
 - algoritmo diagnóstico 236
 - causas 233
 - diagnóstico 234
 - generalizadas 239
 - laboratorio 236
 - localizadas 237
 - parasitarias 205
- Aféresis 8, 365
- Agregación plaquetaria 430, 633, 636-638, 639
 - pruebas 636-638
 - interpretación 637-638
 - muestra 637
 - principio 636
 - procedimiento (micrométodo) 637
- Alfa 2 macroglobulina 461
- Amnioless 58
- Anemia, clasificación morfológica 41-43, 493, 494-495
 - hipocrómica microcítica 42, 494
 - macrocítica (normocrómica) 43, 494
 - normocrómica-normocítica 42, 493, 494
- Anemia aplásica 7, 65-68, 358, 528, 535
 - adquirida (AAA) 65, 67, 68, 75
 - características clínicas 67
 - diagnóstico 68
 - etiología 68
 - hereditaria 67, 68
 - incidencia 66
 - patofisiología 66
 - pronóstico 66
 - tratamiento 68
- Anemia arregenerativa 38-39
- Anemia de Fanconi 65, 413
- Anemia de la enfermedad crónica 79-81, 83, 529, 536
 - diagnóstico 81
 - diagnóstico diferencial 81
 - deficiencia de hierro 83
 - patogénesis 79
- Anemia de la insuficiencia renal 81
- Anemia de los desórdenes endocrinos 83
 - de la disfunción adrenal 83
 - de la disfunción gonadal 83
 - del hipopituitarismo 83
 - del hipotiroidismo (mixedema) 83
- Anemia del paciente cardíopata 83
- Anemia drepanocítica 145-151
 - aspectos clínicos 147
 - diagnóstico 149
 - prenatal 150
 - fisiopatología 146
 - haplotipos del gene β^S 151
 - origen de la mutación de la HbS (β^S) 145
 - tratamiento 147
- Anemia falciforme 31, 145, 599
- Anemia ferropriva 165, 356, 357, 612, 529, 534, 536
- Anemia fisiológica 217
- Anemia hemolítica 40, 87-88, 96-98, 100-101, 121, 123, 124-125, 126, 127-132, 201, 359, 524, 529, 544, 545, 583, 615
 - diagnóstico en niños 101
 - diagnóstico en recién nacidos 100
 - pruebas de diagnóstico 96-97
 - signos 89
- Anemia hemolítica autoinmune (AHAI) 124-125, 583
 - características 124
 - hallazgos de laboratorio 125
- Anemia hemolítica autoinmune por anticuerpos calientes 126
- Anemia hemolítica autoinmune por anticuerpos fríos 127
 - tipo aglutininas frías 127
 - hemoglobinuria paroxismal al frío (HPF) 127
- Anemia hemolítica inducida por drogas (AHID) 127-129
 - clasificación 127
 - mecanismo de adherencia inespecífica 128
 - mecanismo desconocido 128
 - mecanismo tipo complejos inmunes 127
 - mecanismo tipo hapteno 127
 - cuadro clínico 128
 - diagnóstico 128
 - tratamiento 129
- Anemia hemolítica inmunológica 123
 - laboratorio en anemias hemolíticas 123
- Anemia hemolíticas por aloanticuerpos 129-132
 - del recién nacido 129
 - por el sistema sanguíneo ABO 129
 - por antígeno sanguíneo Rho(D) 130
 - por anticuerpos contra antígenos diferentes al D 129
 - diagnóstico de laboratorio 130
 - prevención 131
 - reacciones transfusionales 132
 - tratamiento 131
- Anemia hipoplásica y aplásica 222, 358, 528, 535
- Anemia megaloblástica 40, 57-63, 74, 358, 494, 612, 615
 - ácido fólico 40, 57-58, 59, 60, 61
 - absorción 59
 - función bioquímica 60
 - causas 61
 - deficiencia de vitamina B₁₂ 61
 - deficiencia de ácido fólico 61
 - otras causas 62
 - manifestaciones clínicas 62
 - manifestaciones de laboratorio 62
 - anemias macrocíticas 63
 - determinación de deficiencia de vitamina B₁₂ 63
 - determinación de ácido fólico 63
 - morfología de médula ósea 62
 - morfología de sangre periférica 62
 - pruebas bioquímicas 63
 - vitamina B₁₂ 57-58
 - absorción 58
 - función bioquímica 58
 - transporte 58
- Anemia por deficiencia de hierro 52-56, 165, 529, 612
 - diagnóstico 54
 - diagnóstico diferencial 55
 - prelatente 52
 - latente 52

tratamiento 55
 Anemia por HbCC 154
 Anemia por hepatopatía crónica 82
 Anemia refractaria con exceso de blastos (AREB) 4, 308-310
 Anemia refractaria con exceso de blastos en transformación (AREB-t) 309, 310
 Anemia refractaria con sideroblastos anulares (ARS) 309
 Anemia sideroblástica idiopática 309
 Anemias regenerativas 38, 40
 Aneuploidía 393, 398
 Anomalía (anormalidades morfológicas) 180-181
 Alder-Reilly 180
 Chediak-Higashi 180
 De Jordan 181
 May-Hegglin 180
 neutrofilia gigante 181
 Pelger-Huët 180
 Anormalidades cromosómicas 312, 324-325, 398, 400-401
 Antiagregantes plaquetarios 439, 464, 469-470
 Anticardiolipinas 449
 Anticoagulación 465-470, 482-483, 649-650
 complicaciones 466
 Anticoagulante lúpico 446, 449, 453, 645
 Anticoagulantes de acción *in vitro* 447, 479, 480-482, 486, 514, 515, 545, 546, 591, 641, 649, 650
 heparina 447, 463, 465-466, 480, 481, 486, 515, 545, 649, 650
 sustancias que eliminan el ión calcio 481
 anticoagulante de Wintrobe 481
 citrato de sodio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 481, 546, 591, 641
 solución de citrato-fosfato-dextrosa (CPD) 481
 sales EDTA 481, 514
 Anticoagulantes orales 447, 464, 467-468
 control de laboratorio 467
 interacción con otros medicamentos 468
 Anti-factor Xa 431, 433, 649
 Antitrombina 432, 433, 460, 648
 Aplasia pura de serie roja 65, 358
 Aplasia selectiva de serie roja (ASSR) 69
 eritroblastopenias 69, 515
 Apoptosis 6
 Aspirado de médula ósea 256, 289, 314, 349, 351, 399-400, 526, 527
 Asplenia 228-229, 232
 congénita 228
 funcional 228, 232
 quirúrgica 229

B

Basófilos 182, 200, 321, 325, 520
 anormalidades 182
 basofilia 182, 200, 321, 325
 basopenia 182
 cuantitativas 182
 función 182
 Bazo 1, 227-232, 290, 347, 520, 525
 accesorios 230
 anatomía 227
 anticuerpos 231
 fisiopatología 228
 función 227
 pulpa blanca 228
 pulpa roja 228
 Biología molecular 145, 320, 329, 386, 415-426, 647
 aplicaciones clínicas 423

diagnóstico 424
 leucemia linfoblástica aguda 424-425
 leucemia mieloblástica aguda 426
 leucemia mieloide crónica 426
 leucemia promielocítica aguda 426
 metodologías en biología molecular 415
 análisis de fragmentos (*gene scanning*) 419-420
 extracción de ácidos nucleicos 415
 extracción de ADN 415-416
 extracción de ARN 416-417
 retrotranscripción 417
 secuenciación 422
 seguimiento 424
 Blastos 308, 309, 310, 311, 390, 517
 Budd-Chiari 453

C

Carcinoma metastásico 73, 528
 Cariotipo 311, 314, 396-413
 hiperdiploide 402
 hipodiploide 401
 Cascada de la coagulación 430
 Células germinales 2, 573
 Células hemopoyéticas pluripotenciales 2, 6
 Células madre 1-8, 65, 175, 327, 365-372
 cinética 2
 criopreservación 365
 morfología 2
 movilización 365
 Células natural killer (NK) 75, 196, 388
 Células troncales 2, 6
 Centrómero 396
 Ceruloplasmina 51, 512
 Ciclo de 2,3 DPG 112
 Ciclo del glutatión 112
 Cinética medular 3
 Citogenética 287, 312, 320, 338, 395-413
 análisis citogenético 398-399
 aplicaciones 398-413
 conceptos básicos 395
 diploide 402
 haploide 395
 historia 395
 respuesta citogenética 406
 Citomegalovirus 209
 Citometría de flujo 338, 385-393, 539
 aplicación 387
 ciclo celular del ADN 392
 desventajas 386
 diagnóstico 387
 efectividad del tratamiento 391
 fundamentos 385
 muestras 386
 ventajas 386
 Citomorfología de la serie eritrocítica normal 520-521
 eritroblasto basófilo 521
 eritroblasto ortocromático 521, 608
 eritroblasto policromatófilo 521
 eritrocito 521
 proeritroblastos 520
 reticulocito 521
 Citomorfología de la serie leucocítica normal 517-520
 basófilos 520

- célula plasmática 519
 - células en banda 519
 - eosinófilos 520
 - linfoblastos 517
 - blasto tipo L1 517
 - blasto tipo L2 517
 - blasto tipo L3 517
 - linfocitos 518
 - megacarioblastos 519
 - megacariocitos 520
 - metamielocitos 519
 - mieloblastos 518
 - mielocitos 518
 - monoblastos 518
 - monocitos 518
 - plaquetas 520
 - plasmablastos 519
 - prolinfocitos 517
 - promegacariocitos 519
 - promielocitos 518
 - promonocitos 518
 - proplasmocito 519
 - segmentado 519
 - Citopenias en sida 71
 - Citoquímica 321, 527, 621-632
 - Clasificación inmunofenotípica de las hemopatías 389-391
 - enfermedades linfoproliferativas crónicas 391
 - hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN) 391
 - leucemias agudas 390
 - síndromes mielodisplásicos (SMD) 391
 - síndromes mieloproliferativos (SMP) 391
 - Coagulación intravascular diseminada (CID) 445, 522, 634, 643
 - Cobalamina 58
 - Codocitosis 111
 - Coeficiente mitótico 350
 - Cofactor II de la heparina 460
 - Componentes de la sangre 375, 458, 474
 - etiquetado de los componentes 375
 - Concentrados 375-378, 440
 - leucocitarios 378
 - plaquetarios 375, 377, 440
 - contraindicaciones 377
 - indicaciones 377
 - Crisis aplásicas 210
 - Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) 540, 585, 596, 597, 601, 611
 - Cromosoma 14, 299, 301, 395-413, 541
 - anatomía 396
 - anomalías 398
 - nomenclatura 396
 - Philadelphia 299, 301, 396, 405
 - Cuerpos de Döhle 180
 - Cuerpos de Howell Jolly 524
 - Cuerpos de Pappenheimer 524, 536
 - Cultivo de médula ósea 399
- D**
- Deficiencia de antitrombina (AT) 459, 460
 - Deficiencia de piruvato quinasa (PK) 119-120, 179, 548, 553-556
 - aspectos clínicos 119
 - diagnóstico de laboratorio 120
 - fisiopatología 119
 - genética 119
 - hallazgos en Costa Rica 120
 - Deleción 308, 397, 401, 406, 415, 425
 - del cromosoma 5q 308, 406
 - Dengue 211-213, 516
 - diagnóstico 212
 - epidemiología 211
 - pruebas de laboratorio 212
 - cultivo viral y detección de antígenos 212
 - serológicas 212
 - técnica de reacción de cadena de polimerasa (PCR) 213
 - tratamiento 213
 - transmisión y manifestaciones clínicas 211
 - Desórdenes de la coagulación 441-447
 - adquiridos 444
 - hemofilia A 441
 - hemofilia B 442
 - hereditarios 444
 - por anticuerpos 446
 - Desórdenes de la función plaquetaria 438-441, 447
 - adquiridos 439-440
 - diagnóstico 440
 - hereditarios 438-439
 - tratamiento 440-441
 - Desórdenes vasculares 437
 - adquiridos 437
 - hereditarios 437
 - Diferenciación inmunofenotípica 387-389
 - células mieloides 388
 - células *natural killer* (NK) 388
 - linfocitos B 387
 - linfocitos T 388
 - plaquetas 389
 - serie eritroide 389
 - Dímero D 432, 463, 649
 - Dimorfismo sexual 179
 - Diseritropoyesis 312, 358
 - 2,3-difosfoglicérico (2,3 DPG) 27-31, 112, 474
 - depleción 474
 - efecto del monóxido de carbono 31
 - influencia de la temperatura 29
 - trastornos del equilibrio ácido-básico 31
 - unión con el óxido nítrico 29
 - Donador haploidéntico 369
 - Donador HLA idéntico 369
- E**
- Efecto injerto versus malignidad 367
 - Electroforesis de la hemoglobina 37, 97, 166, 173, 569, 585-586, 591
 - gel de agar-citrato de capa fina (pH 6.0-6.2) 591
 - Electroforesis en acetato de celulosa 586, 590, 593, 595
 - Eliptocitosis estomatocítica 110
 - Eliptocitosis hereditaria (ELH) 39, 104, 105-110
 - diagnóstico de la ELH 109
 - Embarazo 46, 53, 67, 131, 220, 221, 222-225, 453, 459, 468, 512, 515, 534, 581, 615, 631
 - anemia 53, 67, 221, 222-225
 - hipoplásica 222
 - déficit de hierro 53, 221
 - déficit de folato 221
 - déficit de vitamina B₁₂ 221
 - hemoglobinopatías 223
 - complicaciones obstétricas asociadas 223

leucocitos 220
 masa eritrocitaria total 220
 plaquetas 220
 problemas hemorrágicos y trombóticos 224
 trastornos inmunohematológicos 224
 volumen plasmático 220
 volumen total de sangre 220
 Embolismo pulmonar 462
 Enfermedad de cadenas pesadas 263, 332, 339, 343, 360
 de cadenas pesadas μ (miu) 332,339, 343
 de cadenas pesadas α (alfa) 332,339, 343
 de cadenas pesadas γ (gamma) 332,339, 343, 360
 de cadenas pesadas δ (delta) 339, 343
 Enfermedad de Hodgkin 70, 181-182, 184, 187, 188, 189, 230, 234, 243, 257, 318, 351, 355, 528
 Enfermedad de von Willebrand 70, 182, 184, 187, 188, 189, 230, 234, 243-257, 318351, 362, 367, 633, 635, 636, 639
 Enfermedad hepática 111, 445, 447, 468, 524, 652
 Enfermedad injerto contra huésped 67, 367, 370-371, 378, 382
 Enfermedad mínima residual (EMR) 319-320, 416, 424-425
 Enfermedad por HbS y genes de β talasemia y α talasemia 154, 607
 Eosinófilos 181-182, 352, 353, 478, 479, 486-488, 520
 anormalidades 181
 cuantitativas 181
 eosinofilia 181
 eosinopenia 181
 función 181
 Eritema infeccioso 2019, 210, 211
 Eritrocínica 88
 Eritrocitos 1, 33, 35, 41, 87-93, 97, 103, 111, 123, 133, 162, 215, 228, 378, 474-475, 477, 485, 488, 493, 494, 497, 508, 511-515, 521, 523, 524, 541, 542, 550, 557, 573, 574, 575, 577
 cambios nocivos 474
 Eritroenzimopatías 87, 96, 112, 119-120, 121, 541-558
 métodos para detección de eritroenzimopatías 541-558
 cuantificación cinético-enzimática para la deficiencia de G6PD 551
 glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 542
 método de la reducción del azul de metileno 547
 método de tamizaje para deficiencia de G6PD según fluorescencia del NADPH 550
 otras metodologías 552
 prueba de la reducción de la metahemoglobina 545
 prueba del cianuro-ascorbato 548
 Eritrón 35, 489, 492
 Eritropoyesis 33-35, 39, 40, 46, 80, 81, 84, 217, 355, 358, 528
 Eritropoyetina 6, 34, 84, 489
 aplicaciones 6
 Erlichiosis 180
 Esferocitosis 39, 95, 96, 104-109, 568, 575, 577-580
 diagnóstico diferencial 108
 hallazgos de laboratorio 106-108
 hereditaria clásica (EH) 105, 580
 neonatal 108
 Esplenomegalia 70, 97, 105, 150, 164, 229-231, 290, 291, 292, 293, 438, 522, 528
 causas 229, 230
 clasificación 229
 Esterasas, técnica 320, 627-630
 Estimulación blástica 196
 Estomatocitosis hereditaria 110
 Expresión de antígenos funcionales y receptores 196

Extracción sanguínea 374-375, 471, 472, 473
 complicaciones 473

F

Factor II G20210A 43, 427
 Factor intrínseco (FI) 57, 58
 Factor V Leiden 427, 459-460, 647
 Factores estimulantes de colonias (FEC) 6-8, 255
 aplicaciones terapéuticas 6
 FEC-G 6, 7
 FEC-GM 6, 7, 8
 FEC-GM recombinante humano 7
 indicaciones clínicas 7
 Ferritina sérica 52, 55, 84, 537-538
 Ferroportina 46, 47, 48, 79, 539
 Fibrinógeno 219, 430, 433, 444, 458, 459, 461, 463, 478, 643, 644
 Fibrinólisis 433-435
 Fibrinolíticos 465, 468-469
 FISH (*Flourescence in situ hybridization*) 324, 338, 340, 395, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 407-412
 Flujo sanguíneo 458
 Fosfatasa alcalina leucocitaria (FAL) 301, 630-632
 Fragilidad osmótica (FO) 92, 96, 107, 165, 479, 577-582
 prueba de FO completa para el diagnóstico de esferocitosis 96, 107, 577-580
 prueba de la autohemólisis (técnica simplificada) 582
 prueba para detectar FO disminuida 165, 580
 pruebas de la lisis con glicerol 580-581
 prueba rosada de la glicerólisis ácida (Pink test) 580-581
 Frotis sanguíneo 131, 521-523, 556
 color (cromia) 523
 eritrocitos 523
 forma 523
 preparación del frotis 522
 preparación del material 522
 preparación, tinción y análisis 522
 tamaño 523

G

Gammapatías monoclonales 331-344
 benignas 344
 citogenética 338
 clasificación 332, 338
 clínica 332
 detección del componente monoclonal 333
 frecuencia 332
 inmunofenotipo 338
 inmunoglobulinas 336
 médula ósea 338
 proteína de Bence-Jones 337
 síntomatología 335
 Ganglios linfáticos 185, 227, 232, 236, 238, 243
 anatomía 232
 función 232
 Gen 281, 301, 319, 320, 324, 325, 328, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 408, 409, 410, 411, 419, 420, 423-425, 427
 BCR-ABL p190 419
 BCR-ABL p210 419
 CBFB-MYH11 325, 404, 408, 419
 E2A-PBX1 324, 403, 419
 ETV6-RUNX1 [*TEL-AML1*] 319, 400, 401, 402, 409, 410, 411, 419, 423, 424

- FLT3 328, 420, 423, 424, 425
 HOX11 401, 409, 423, 425
 MLL-AF4 319, 419
 NPM 281, 320, 410, 423, 424
 PML-RARa 325, 403, 404, 408, 410, 411, 419, 421, 424, 426
 RUNX1-RUNX1T1 [AML1-ETO] 319, 400, 401, 402, 403, 404, 408, 409, 410, 411, 419, 423, 424
 SIL-TAL1 419, 425
Gene scanning 419-420
 Genes de fusión 139, 405, 419, 423, 425
 Glicólisis 27, 112-113, 114, 474, 553
 Glivec 419, 422, 424, 426
 Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) 112-119, 121, 179, 541, 542-552
 aspectos clínicos 117
 deficiencia 113, 115, 179, 542-544
 anemia hemolítica aguda 118, 544
 anemia hemolítica crónica no esferocítica (AHCNE) 115, 117, 119, 545
 diagnóstico de laboratorio 545
 hereditaria 113
 epidemiología 114
 ictericia neonatal 117, 121, 544
 presentación clínica 544
 estructura molecular 114
 fase hemolítica aguda 118
 fase de recuperación 118
 fase de resistencia o equilibrio 118
 función 114
 genética 116
 hallazgos en Costa Rica 117, 118
 hemólisis 114-116, 117
 Granulación tóxica 180
 Granulopoyesis 355, 528
 Grupo hem 11, 15, 16-19, 48, 135, 499, 567
 biosíntesis del grupo hem 16-19
 ácido δ -aminolevulínico (A δ AL) 16
 coproporfirinógeno III (copro-genio III) 17
 ferroprotoporfirina IX (grupo hem) 18, 135
 porfobilinógeno (PBG) 17
 protoporfirinógeno IX (proto-genio IX) 17
 protoporfirina IX 18
 uroporfirinógeno I (uro-genio I) 17
 uroporfirinógeno III (uro-genio III) 17
H
 Haptocorrinas 57
 Haptoglobina plasmática 96, 562-565
 cuantificación por electroforesis 562-564
 determinación por gel-filtración 564-565
 Haptoglobinas séricas 478, 559-562
 método de peroxidación 559-562
 HBA₂ 162, 163, 173, 611, 612-615
 cuantificación por electroforesis-elución 611-612
 método micromatográfico 612-613
 micromatografía para HBA₂ y HbS en DE-52 celulosa 614-615
 Hb fetal (HbF) 1, 15, 134, 135, 145, 148, 150, 152, 162, 163, 169, 173, 593, 594, 615-619
 cuantificación 615-618
 determinación 615
 causas de error 618
 técnica de elución ácida para HB fetal eritrocitaria 618-619
 Hematopoyesis 1-7, 65, 73, 175, 183, 227, 230, 234, 347, 365, 366, 527
 citoquinas 5
 factores inhibidores 6
 regulación 6
 Hemocomponentes, procedimientos especiales 378
 leucorreducción 378
 desventajas 378
 indicaciones absolutas 378
 indicaciones clínicas 378
 indicaciones relativas 378
 irradiación 378
 Hemocromatosis 46, 51-52
 Hemoglobina 11-32, 33, 39, 45, 92, 96, 97, 98, 133-143, 154, 155, 158, 166, 172, 173, 175, 216, 218, 374, 475, 476, 477, 478, 479, 493, 494, 496, 499-506, 539, 569, 570, 580, 585-597, 599-602, 603-608, 611, 614
 cadenas polipeptídicas 11-12, 14
 genética y síntesis 14
 catabolismo 92
 curva de disociación 24, 27
 determinación en plasma 96
 estructura 11-14, 26
 parte proteica 12-13
 parte no proteica 14
 función 23-26, 30
 transporte del bióxido de carbono 25
 transporte del oxígeno 23
 genética y síntesis 14
 grupo prostético 11, 14, 15, 19
 metabolismo 19
 errores innatos 19
 papel biológico 23
 P₅₀ óptima 30
 prueba para diferenciar hemoglobina y mioglobina en orina 570
 diferenciación por electroforesis 570
 reacciones y propiedades 499
 reticulocitaria 539
 talasémica 173
 variantes de Hb autóctonas o infrecuentes en Costa Rica 142
 Hemoglobina C (HbC) 137, 143, 151, 153-154, 167, 525, 570, 586, 593, 594, 595, 611
 enfermedad homocigota por HbC 153
 enfermedad por HbsSC 154
 Hemoglobina E 142, 169, 173, 593, 594, 606, 611
 Hemoglobina M (Hbs M) 142, 155, 547, 569
 Hemoglobina S 31, 97, 137, 143, 145, 150, 151, 152, 154, 167, 586, 593, 594, 599-602, 614, 615
 pruebas para detección de HbS 599-602
 prueba de inducción de drepanocitos 601-602
 prueba de solubilidad cuantitativa 601
 prueba de solubilidad de la Hb 97, 599-600
 prueba de solubilidad diferencial con urea 600-601
 Hemoglobinas anormales 133-143, 569, 583, 603, 605-608, 612
 bases genéticas 136
 bases moleculares 136-138
 con una función de heme anormal 141
 de agregación o insolubles 141
 inestables 141, 142, 569, 583, 605-607, 612
 mutaciones 136 - 139
 mutación puntual 136
 mutaciones por errores terminales 138

mutaciones con desviación en el marco (Frame-Shift) 138
 mutaciones con pérdida de residuos 138
 mutaciones por entrecruzamiento meiótico desigual 138
 producidas por síntesis desbalanceada 141
 sin aberración fisiológica 141
 Hemoglobinas con alterada afinidad hacia el oxígeno 155
 Hemoglobinas humanas normales 134, 158, 216, 559
 genes 134
 organización 134
 Hemoglobinas inestables 97, 139, 141, 142, 154, 569, 583, 605-607, 612
 Hemoglobinopatías 19, 87, 100, 136, 140, 145, 223, 479, 603
 clasificación 141
 cualitativas 140
 cuantitativas 140
 Hemoglobinometría y hematocrito 499-510
 Hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN) 39, 65, 67, 68, 70, 75-76, 96, 318, 367, 391, 392, 459, 573-575, 615
 determinación 96, 573-575
 prueba de la inulina 96, 573
 pruebas presuntivas y confirmatorias de la lisis por sacarosa 96, 574
 prueba de suero acidificado 96, 574-575
 diagnóstico diferencial 76
 evolución 76
 patogénesis 75
 tratamiento 76
 Hemograma 37, 200, 308, 463, 478, 485-498
 automatizado 495-498
 analizadores 495-498
 manual 485-495
 cómputo de eosinófilos 486
 cómputo de eritroblastos 486
 cómputo de eritrocitos 485
 cómputo de leucocitos 485-486
 cómputo de plaquetas 489-492
 cómputo indirecto 491
 líquidos de dilución para los cálculos directos 489
 método directo de Rees-Ecker 490
 método directo utilizando plasma 491
 cómputo de reticulocitos 488-489
 interpretación 489
 error de cálculos manuales 492
 errores de equipo 492
 errores técnicos 492
 toma de muestras 492
 sangre capilar 492
 sangre venosa 492
 índices eritrocíticos de aplicación clínica 492
 concentración de Hb corpuscular media (CHCM) 33, 95, 108, 111, 150, 165, 477, 492, 494, 496, 523
 hemoglobina corpuscular media (HCM) 33, 37, 38, 52, 97, 150, 165, 171, 173, 477, 493, 494, 496
 volumen corpuscular medio (VCM) 33, 37, 52, 71, 97, 150, 163, 165, 166, 171, 173, 477, 493, 494, 496, 523
 método de Randolph 486-487
 estudio de eosinófilos en secreciones 487
 método de Hansel (modificado) 487
 método indirecto para eosinófilos 487
 Hemólisis 39, 81, 88-89, 93-94, 96, 99, 103, 114-116, 117, 123, 132, 146, 492, 515, 533, 544, 566, 573, 578, 579, 580, 581, 582

fisiopatología 94
 oxidativa 88, 114-116
 mecanismo de hemólisis 115
 signos 89
 Hemolizado completo 603-605
 hemolizante EDTA-KCN 603
 preparación 604
 Hemosiderina 45, 51, 52, 356, 357, 358, 360, 529, 535
 Hemostasia 429-435, 633-639
 hemostasia primaria y agregación plaquetaria 633-639
 cofactor de ristocetina 638
 cómputo de plaquetas 634
 tiempo de cierre (PFA 100) 635
 tiempo de sangrado 635
 Heparinas 432, 438, 447, 460, 463-467, 479, 480, 481, 486, 512, 524, 545, 649, 650
 fraccionada 466
 no fraccionada 463, 464, 465-466
 Hepatitis viral 117
 Hepcidina 46, 79, 539-540
Hidra vacciniiforme 282
 Hierro 39, 45-55, 80, 81, 83-84, 134, 165, 221, 351, 354, 356-360, 381, 314, 478, 499, 527, 529, 531-540, 612
 absorción 46-49
 almacenamiento 49
 aspectos nutricionales 46
 distribución 45
 metabolismo 45
 regulación 47
 transporte 49
 Hiperesplenismo 68, 70, 71, 74, 88, 105, 230-231, 358, 362
 Hiperhomocisteinemia 458, 461
 Hiperploidía 393
 Hipoploidía 393
 Hirudina 482
 Histiocitosis 279, 281, 356, 359
 hemofagocitante 356
 tesaurismótica 356
Hydrops fetalis 68, 130, 131, 170, 171, 172, 209, 210
 diagnóstico de laboratorio 130
 tratamiento 131

I

Imatinib mesylate (Gleevec) 328, 405, 407
 Inclusiones eritrocíticas 524-525
 anillos de Cabot 524
 cristales de hemoglobina C 525
 cuerpos de Pappenheimer 524
 punteado basófilo 524
 Infancia, cambios hematológicos 215-218, 477, 478, 493, 494
 plaquetas y factores de la coagulación 218
 serie blanca 217
 serie roja 215
 Infección intrauterina 210
 Infecciones bacterianas 178, 206
 bartonelosis 206
 clostridios 206
 leptospirosis 206
 tuberculosis 206, 528
 Infecciones del intestino delgado 205
 Infecciones micóticas 213
 Infecciones parasitarias 145, 170, 181, 200-205, 361
 amebiasis 203, 205

angiostrongiliasis abdominal 204
 anquilostomiasis 204
 ascaridiasis 204
 cisticercosis 205
 enfermedad de chagas 203
 enterobiasis 204
 strongiloidosis 204
 filariasis 181, 205
 leishmaniasis 203, 361
 malaria 145, 170, 181, 200, 202, 361
 otros protozoarios 205
 toxocariasis (Síndrome de *larva migrans* visceral) 181, 204
 toxoplasmosis 181, 200, 205
 tricuriasis 204
 Infecciones virales 200, 206, 233, 362-363, 438, 544
 Inhibidores de la coagulación 432, 433, 438, 447, 460, 463-467, 479, 480, 481, 486, 512, 524, 545, 649, 650
 heparina 432, 438, 447, 460, 463-467, 479, 480, 481, 486, 512, 524, 545, 649, 650
 oxicumarínicos 480
 Inmunofenotipo 251, 273, 274, 276, 282, 288, 292, 319, 338, 518
 Inmunoglobulinas 188, 196, 260, 331, 336-337, 342, 376, 424, 519
 Interleuquinas 195, 196
International System of Human Cytogenetic Nomenclature 2013 (ISCN) 396-397
 IRE (elementos respuesta del hierro) 48-49
 IRP (proteínas reguladoras del hierro) 48-49

L

Leucemia aguda 70, 72, 317-327, 367, 621-632
 del niño 319, 327
 clasificación 320-322
 inmunológica 322
 morfológica 320-321
 clasificación de la LMA según la OMS 325
 clínica 318
 factores predisponentes 317-318
 adquiridos 317-318
 congénitos 317-318
 hereditarios 317-318
 fisiopatología 317
 patobiología 317
 pronóstico 319-320
 tratamiento 326
 consolidación 326
 inducción a la remisión 326
 mantenimiento 326
 Leucemia de células peludas 68, 73, 263, 292, 293, 359, 627
 Leucemia eosinófila crónica/síndrome hipereosinófilico idiopático (CEL/HES) 303, 304, 406
 Leucemia linfoblástica del adulto 327-328
 Leucemia linfocítica aguda (LLA) 72, 317, 324, 367, 400-402, 409, 410, 419, 423, 425, 623, 625
 alteraciones numéricas 401
 alteraciones cromosómicas estructurales 402
 T (LLA-T) 323, 324, 390, 400, 401, 409, 419, 423, 425
 Leucemia linfocítica crónica (LLC) 124, 178, 189, 230, 234, 263, 265, 285, 287-291, 295, 332, 342, 354, 359, 367, 409, 411, 438, 517, 529
 B (LLC-B) 287-291
 aspirado de médula ósea (clasificación) 289
 complicaciones clínicas 290
 cuadro clínico 289
 diagnóstico 288

 epidemiología 288
 inmunofenotipo 288
 modalidades terapéuticas 291
 tratamiento 291
 Leucemia mieloblástica del adulto 328-329
 Leucemia mielocítica aguda (LMA) 65, 72, 311, 320, 321, 323-326, 329, 390, 403, 404-405, 408, 411, 419, 423, 425, 426, 622, 623, 624, 628, 629
 Leucemia mielocítica crónica (LMC) 230, 234, 299, 318, 356, 360, 367, 405, 406, 408, 419, 423, 424, 425, 426, 517, 615, 630
 Leucemia mieloide crónica BCR/ABL positiva 299, 300-301, 405
 cuadro clínico 301
 evolución 301
 fosfatasa alcalina leucocitaria 301
 laboratorio 301
 utilidad 301
 Leucemia mielomonocítica crónica (LMMC) 4, 308, 309, 310, 311, 313
 Leucemia neutrofílica crónica 406
 Leucemia prolinfocítica B (LPC-B) 263, 285, 286, 291-292
 características 291
 Leucemia promielocítica aguda (LPA) 325, 367, 426
 Leucemia/linfoma T del adulto 263, 279, 286, 296
 Leucemias inclasificables 323
 Leucocitos 175-191, 200, 218, 220, 319, 361, 475, 477, 478, 485-486, 496, 508, 525, 557
 cinética 175
 conservación 475
 función 175
 producción 175
 separación 475, 557
 Leucograma 190-191
 Leucopoyesis 175
 Linaje células B 323, 517
 Linaje células mieloides 323
 Linaje células T 323, 517
 Linfadenopatías persistentes 239
 Linfocitos 75, 76, 184-189, 193-196, 200, 207, 218, 233, 240, 244, 248, 249, 250, 251, 259, 260-261, 263, 264, 265, 268, 274, 278, 285, 288, 295, 352, 353, 356, 370, 388, 478, 518, 519
 función 186, 193, 218
 Linfocitos B 5, 76, 185-186, 187, 188, 194-195, 207, 218, 233, 244, 259, 260, 264, 268, 283, 285, 387, 388, 519
 desarrollo 260
 maduración 260
 linfomas de linfocitos B maduros 264
 Linfocitos T 5, 76, 186, 188, 193, 194, 196, 218, 227, 259, 260, 261, 264, 278, 283, 285, 347, 370, 388, 627
 neoplasias de precursores de linfocitos T 264
 linfoma linfoblástico T/leucemia linfoblástica aguda T 264
 Linfoma ALK (linfoma anaplásico kinasa) 263, 281, 412-413
 Linfoma de Burkitt (LB) 209, 254, 263, 276-277, 282, 286, 294, 409, 412
 t(8;14)(q24;q32) 412
 Linfoma de células del manto (LCM) 266, 286, 294, 367
 Linfomas de células precursoras linfoides 262, 263-264
 Linfoma de Hodgkin (enfermedad de Hodgkin -EH-) 70, 104, 182, 187, 189, 230, 234, 243-257, 259, 318, 351, 359, 528
 biopsia de médula ósea 256
 células de Reed-Sternberg 243, 244, 246, 257
 origen 246
 variantes 246
 clasificación 245
 cuadro clinicopatológico y citocinas 255

definición 243
 diagnóstico diferencial 251-253
 etiología 253
 incidencia 245
 inmunofenotipo 251
 pronóstico 256
 recaídas 256
 relación con VIH 257
 relación con virus Epstein-Barr (EBV) 253-255
 subtipos 245, 247-250
 celularidad mixta 245, 250
 depleción linfocítica 245, 250
 esclerosis nodular (EN) 245, 249-250
 grados de esclerosis nodular 250
 LH clásico rico en linfocitos (LHCRL) 248
 nodular de predominio linfocítico (NPL) 247-248
 tratamiento 257
 Linfoma de la zona marginal (LZM) 263, 269, 270-273, 286, 295
 esplénico 263, 270, 272-273, 286, 295
 extranodal de tipo MALToma 263, 270-272, 286, 295
 nodular (nodal) 270, 272, 286
 Linfomas de linfocitos pequeños/leucemia linfocítica crónica (LLC) 252, 265-266
 Linfoma difuso de células B grandes (LDCBG) 251-252, 262, 263, 269, 273, 274, 275, 276, 278, 282, 409
 difuso de células B grandes primario del mediastino 252, 273, 275
 intravascular 263, 276
 Linfoma folicular (LF) 189, 263, 266, 268-269, 286, 293-294, 367, 409, 412
 Linfoma/leucemia de linfocitos precursores B 263-264
 Linfoma linfoplasmocítico (LLP) 263, 266, 286, 295
 Linfoma MALT (linfoma células B asociado a mucosa) 263, 270-272, 295, 410, 412
 Linfoma no Hodgkin (LNH) 189, 234, 251, 252, 257, 259-283, 286, 293, 332, 412
 clasificación 262-263
 en niños 281, 282
 asociados a Epstein-Barr 281
 incidencia 260
 Linfoma primario de efusión 263, 276
 Linfomas de la zona marginal 262, 263, 266, 269-273, 286, 295
 Linfomas de linfocitos T y NK maduras 263, 278-281, 413
 ALK-1 positivo 263, 280-281
 ALK-1 negativo 263, 280-281
 anaplásico de células T grandes (LACG) 280, 413
 hepatoesplénico, T 263, 280
 leucemia/linfoma T del adulto 279
 micosis fungoides y Síndrome de Sézary 278
 primario cutáneo 263, 281, 282
 T angioinmunoblástico 279
 T asociada a enteropatía 279
 T/NK extranodal, nasal y tipo nasal 279
 T periféricos 278
 T positivos para CD30 281
 T subcutáneo paniculítico 263, 280
 Linfomas no Hodgkin B con expresión periférica 189, 209, 254, 263, 269, 270-273, 276-277, 282, 286, 293-295, 409, 412
 Burkitt 209, 254, 263, 276-277, 282, 286, 294, 409, 412
 de células del manto leucemizado (LCM) 286, 294
 de la zona marginal 263, 269, 270-273, 286, 295
 esplénico (LZME) y nodal 286, 295
 extranodal tipo MALT 263, 270, 286, 295

difuso de células grandes B 286, 294
 folicular 189, 263, 266, 268-269, 286, 293-294, 367, 409, 412
 linfocítico de célula pequeña 294
 linfoplasmocítico (LLP) 286, 295, 263, 266
 Linfopoyesis 260-261, 356

M

Macroglobulinemia de Waldeström (MW) 73, 189, 230, 295, 331, 332, 339, 342, 360
 Mastocitosis primaria 304-305
 diagnóstico 304
 patogenia 304
 pronóstico 305
 signos y síntomas 304
 tratamiento 305
 Medicina transfusional 373-383
 categorías de donantes 374
 exámenes previos 374
 auto-exclusión confidencial de unidades 374
 examen físico 374
 historia clínica 374
 hematocrito 374
 hemoglobina 374
 interrogatorio clínico 373
 reacciones adversas 383
 riesgos clínicos 381
 selección de donadores 373
 Médula ósea (MO) 1, 7, 33, 34, 35, 37, 39, 47, 55, 57, 62, 68, 72, 88, 89, 149, 175, 195, 256, 289, 304, 308, 309, 312, 338, 347-362, 370, 386, 387, 388, 389, 392, 393, 399-400, 403, 407, 517, 525-530, 535, 536, 621
 análisis del material 350, 399, 526
 aspirado 256, 289, 314, 349, 351, 399-400, 526, 527
 biopsia 349, 351, 526, 528
 clasificación del estado de las reservas de hierro (hemosiderina) 356, 529
 estudio microscópico 528
 infantes y niños 353, 528
 justificaciones para realizar el análisis de MO 354, 528
 mielograma 347-362, 525, 527, 529
 reporte 351-353, 527
 obtención del material medular 349, 525
 organización 525
 patrón del hierro tisular y sideroblástico en médula ósea 356, 529
 patrones medulares clásicos en diversas hemopatías 354
 preparación de material 349, 526
 técnicas de la punción 354
 Membrana eritrocítica 89-90, 103-104
 Membranopatías 87, 103, 577-583
 Metabolismo del hierro 45-56, 531-540
 capacidad total de fijación del hierro (CTFFe) 52, 81, 532
 fundamento de la prueba 532
 cuantificaciones de FeS, CTFFe e IS 52, 531
 disolución de batofenantrolina 531
 disolución madre de hierro 531
 hierro sérico 533
 cálculos 533
 cuidados en la determinación de FeS y CTFFe 533
 determinaciones de FeS, CTFFe e IS 534
 hierro sérico en hepatopatías 535
 índice de saturación de la Tf 534
 procedimiento 533
 valores de referencia 534

patrón (P) de 250 µg/dl 532
 preparación de cristalería libre de hierro 531
 preparación de reactivos 531
 tampón glicina-HCl pH 1,9 531
 preparación del tampón de trabajo 532
 tinción de hierro en médula ósea 535-536
 fundamento 535
 interpretación 536
 método 536
 mezcla de contratinción 535
 procedimiento 535
 procedimiento modificado para tinción de
 hemosiderina 535
 reactivos de reserva 535
 reactivos de trabajo 535
 tipo de muestra 532
 Metahemoglobina (MetaHb) 115, 121, 139, 478, 545-547, 559, 560,
 568-569, 603
 determinación 568
 Metahemoglobinemia 155, 169
 Método ELISA para determinación de ferritina sérica 537-538
 fundamento 537
 materiales y reactivos 537
 valores de referencia 538
 Microambiente hemopoyético 4
 Mielofibrosis 4, 68, 73, 230, 302-303, 325, 351, 356, 360, 363, 367, 406,
 438, 524, 528, 615, 630
 primaria (MFP) 4, 230, 302-303, 360, 406, 630
 clínica 303
 criterios de diagnóstico 302
 laboratorio 303
 Mielograma 340, 347-363, 440, 525-527, 529
 Mieloma múltiple 70, 73, 178, 318, 331, 332, 338, 339-342, 360, 362,
 367, 409, 412, 438
 índice pronóstico 341
 no secretores 338, 341
 Mieloma y macroglobulinemia 73
 Mieloperoxidasa (MPX), reacción 621-622, 624, 629
 Mieloptisis 68, 356, 524
 Mononucleosis 200, 206-208, 229, 230, 360, 361, 362, 525
 infecciosa 207, 229, 230, 361, 362
 diagnóstico 208
 hallazgos de laboratorio 208
 sintomatología 207
 tratamiento 208
 Monosomía 67, 312, 325, 405, 408-409, 411, 412

N

Neutrófilos 66, 67, 176-181, 200, 311, 312, 353, 478, 519
 anormalidades 177-181
 adquiridas 179
 cuantitativas 177-178
 neutrofilia 178, 200
 gigante 181
 neutropenia 177
 funcionales 178-179
 morfológicas 179-180
 hereditarias 180
 función 176
 hipersegmentados 180
 Neutropenia 4, 7, 71, 77, 184, 199, 200, 313, 361, 469, 522
 crónica 7
 por quimioterapia 7

por medicamentos 7, 469
 Nicho celular 3

P

Pancitopenia 62, 65, 68, 70-72, 74, 292, 308, 362, 529
 en infección 70
 evaluación del paciente 71
 hallazgos de laboratorio 71
 interrelaciones clínicas 70
 Papulosis linfomatoide 281
 Pared vascular 457
 Parvovirus B19 69, 209-211
 Persistencia hereditaria de hemoglobina fetal (PHHBF) 134,
 145, 150, 157, 163, 167, 169, 173, 600, 611, 612, 615
 Pigmentos respiratorios 11
 Pirimidina 5' nucleotidasa 120, 121, 541, 556, 557
 deficiencia 120, 556, 557
 método de escrutinio 556
 Piroptocitosis hereditaria (PPH) 104, 110
 Piruvato quinasa (PK) 39, 96, 119, 179, 541, 553-556
 deficiencia 39, 119, 179, 541, 553-556
 cuantificación cinético-enzimática 554-556
 método de escrutinio 553-554
 Plaquetas 66, 67, 218, 219, 220, 375, 377, 379, 380, 389, 429-430, 437,
 438, 439, 440, 443, 447, 461, 466, 470, 474, 478, 479, 489-492, 497, 508,
 520, 525, 634, 636
 estructura plaquetaria 429
 conservación 474
 proceso de formación del tapón plaquetario 430
 Plasmacitosis 355-356, 360
 PML/RAR α -ácido transretinoico 325, 403, 411
 Policitemia vera 4, 300, 355, 360, 406, 615, 630
 criterios diagnósticos 300
 cuadro clínico 300
 evolución 300
 laboratorio 300
 Polietanol-sulfato sódico 482
 Poliglutamatos 57, 60
 Porfirias 19-23, 651-654
 clasificación 20-21
 defectos enzimáticos 20
 diagnóstico clínico de las porfirias 22-23
 síntomas dermatológicos (porfiria cutánea) 23
 síntomas neurovisceral (porfiria aguda) 22
 distribución geográfica y frecuencia de las porfirias 21-22
 otras variedades de porfiria 22
 porfiria aguda intermitente (PAI) 21
 porfiria eritropoyética (PE) 21
 protoporfiria eritropoyética (PPE) 22
 pruebas de laboratorio 651
 análisis cualitativo de una muestra de orina 653
 análisis cualitativo de una muestra de sangre 653
 análisis cualitativo de una muestra fresca de orina 651
 método de Rimington y Cripps 653
 prueba de Hoesch para el estudio de pacientes con
 porfiria aguda 22, 652
 prueba de Lee 653
 prueba de Watson-Schwartz 651
 Procedimientos colorimétricos 500-510
 control de calidad de la Hb y otros analitos 505
 datos obtenidos del hematocrito 508
 capa de eritrocitos 508
 capa de leucocitos y plaquetas 508

volumen plasmático 508
 hematocrito 506, 509
 hemoglobimetría 499, 504
 método manual para determinación de Hb por HiCN 500
 método de Wintrobe 352, 477, 506-507, 513, 514
 microhematocrito 507
 Proteína C (PC) 427, 432, 459, 460, 461, 463, 648
 Proteína R 58
 Proteína S (PS) 432, 433, 450, 459, 461, 648-649
 Protoporfirina eritrocítica unida a zinc (PE-Zn) 478, 538
 Pruebas pretransfusionales 378-379
 prueba cruzada mayor 378
 rastreo de anticuerpos anti-eritrocitos 378
 Púrpura trombocitopénica 98, 361, 363, 497
 idiopática inmune 361
 inducida por drogas 361

Q

Quebraduras cromosómicas 413

R

Rasgo de HbS (HbAS) 152, 594, 559
 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) 140, 150, 196, 254, 369, 417-418, 420
 cualitativa 417-418
 cuantitativa 420
 Reacciones 16, 67, 125, 132, 190, 191, 229, 361, 378, 382, 383, 445, 499, 542, 554, 630
 leucemoides 190, 361, 630
 anemias 190
 intoxicaciones 190
 neoplasia 190
 osteomielopatías 190
 procesos infecciosos 190
 leucoeritroblásticas 191
 transfusionales 132, 378, 383
 Rearreglos 195, 278, 400, 401, 402, 403, 405, 410, 418, 423, 425
 cromosómicos 403, 410
 de inmunoglobulina 423, 425
 del receptor de células T (TCR) 278, 418, 425
 Receptor soluble de transferrina (RsTF) 538-539
 fundamento 538
 interpretación 539
 materiales y reactivos 538
 método ELISA para determinación de RsTF 538
 procedimiento 539
 utilidad práctica de la determinación del RsTF 539
 Reservas de hierro 351, 354, 356, 527, 529
 clasificación 356, 529
 Resistencia a la proteína C activada (RPCA) 460, 463, 467
 Riesgo trombótico 463
 estratificación 463

S

Sangrado 39, 376, 377, 379, 437, 443, 478, 633, 635, 641-646
 diagnóstico y cuantificación de factores 641-646
 cuantificación de factores 644
 cuantificación de inhibidores del factor VIII 645
 determinación del fibrinógeno 643
 investigación del anticoagulante lúpico 645
 investigación del factor XIII 645
 productos de degradación del fibrinógeno/fibrina 644
 tiempo de protrombina 642

tiempo de trombina 643
 tiempo de tromboplastina parcial (TTP) 642
 Sangre (manejo y componentes) 23, 38, 53, 54, 55, 62, 97, 149, 176, 182, 195, 220, 309, 312, 366, 370, 373-383, 387, 400, 407, 430, 438, 445, 446, 458, 471-474, 475, 476, 477, 479, 480, 481, 482, 483, 485, 490, 492, 500, 504, 507, 518, 523, 583, 600, 604, 621, 641, 653
 en el servicio de enfermería 381
 en sala de operaciones 381
 capilar 471-472, 473, 476, 492, 504, 507
 punción 471, 507
 conservación 474, 481
 fraccionamiento de la unidad de sangre 375-376
 crioprecipitados 376
 glóbulos rojos empacados, indicaciones 375
 plasma fresco, indicaciones 376
 manejo de muestras sanguíneas 387
 manipulación de las muestras 474
 tamizaje de las unidades de sangre 375
 venosa 473, 476, 492
 Secuenciación 369, 422
 Serie granulocítica 175-176, 622, 623, 628, 629
 clasificación 176
 envejecimiento y muerte 176
 maduración 176
 pasaje a la circulación 176
 Serie linfocítica 184-189, 517
 anormalidades funcionales 187
 por deficiencia de los linfocitos B 187
 por deficiencia heredada de los linfocitos B y T 188
 por deficiencia heredada del linfocito T 188
 por deficiencia adquirida del linfocito B 188
 por deficiencia adquirida del linfocito T 188
 anormalidades morfológicas 189
 Síndrome de Sézary 187, 263, 278, 286, 296, 297, 359
 diferenciación entre linfocitos B y T 186
 función 186
 linfocitos B 185
 linfocitos T 186
 marcadores linfocitarios 185
 migración 185
 muerte 185
 origen 185
 sobrevida 185
 tamaño 185
 Serie monocítica 182-184, 622, 630
 anormalidades 183, 184
 cuantitativas 184
 monocitosis 184
 defensa 183
 función 183
 funciones cooperativas y efectoras 183
 remoción de desechos 183
 regulación e interacciones 183
 síntesis de compuestos 184
 Serie plasmacítica 190
 Síndrome anémico (anemia) 33-44, 97, 123
 abordaje del paciente anémico 37
 clasificación fisiopatológica de la anemia 38, 39
 clínica del paciente anémico 36
 contenido reticulocitario de hemoglobina (CHr) 38
 reticulocitos 33, 37, 97, 123
 Síndrome antifosfolípido 70, 449-454, 462
 autoanticuerpos 449

características 450
 criterios diagnóstico 453
 detección de laboratorio 453
 epidemiología 450
 historia 449
 inmunopatología 450
 manifestaciones clínicas 452
 Síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida) 6, 70, 71, 74, 201, 205, 250, 277, 362
 Síndrome de las plaquetas pegajosas 461
 Síndrome de Sézary 187, 263, 278, 286, 296, 297, 359
 Síndrome hipereosinofílico 182, 303-304, 406
 hallazgos de laboratorio 304
 patogenia 303
 pronóstico y tratamiento 304
 signos y síntomas 303
 Síndromes de mononucleosis 206-211
 virus de Epstein-Barr (EBV) 67, 206, 208, 248, 252, 253, 254, 255, 263, 281, 318
 Síndromes drepanocíticos 142, 145-151, 515, 524, 601
 Síndromes linfoproliferativos crónicos 285-297, 332, 359, 391
 B con expresión leucémica 287-293
 criterios generales 286-287
 Síndromes linfoproliferativos crónicos T 295-297
 leucemia de linfocitos grandes granulares (LLGG) 295
 leucemia prolinfocítica T (LPC-T) 296
 leucemia/linfoma T del adulto (LLTA) 296
 características de laboratorio 296
 manifestaciones clínicas 296
 pronóstico 296
 micosis fungoide y síndrome de Sézary 296-297
 tratamiento 297
 Síndromes mielodisplásicos (SMD) 4, 7, 65, 68, 70, 307, 314, 355, 358, 391, 403, 411, 438, 520, 524, 622, 624
 alteraciones funcionales 311
 alteraciones morfológicas 311
 aspectos clínicos 307
 biopsia de MO 314
 citogenética 312
 clasificación 308-309
 clasificación pronóstica (IPSS) 310-311
 diagnóstico diferencial 311
 etiología 307
 patobiología 307
 pronóstico 313
 evolución 313, 314
 tratamiento 314
 Síndromes mieloproliferativos crónicos 299-305, 318, 360, 362, 391, 520
 alteraciones genéticas 299-300
 BCR/ABL 299, 300, 324, 405, 409
 JAK-2 299, 300, 418, 423
 LNK 300
 MPL W515L 299, 302
 Sistema IRE/IRP 48-49
 Sondas 407, 408, 409, 411, 412, 420, 421
 break-apart 408, 409, 411
 de enumeración centromérica (CEPs) 407
 de hibridación 421
 de hidrólisis 420
 identificadora del locus específico (LSI) 408
 Stem cells 2, 175
 Sudán negro B (SNB) 624-625

T

Talasemia 39, 134, 154, 157-174, 355, 356, 367, 524, 529, 535, 536, 594, 607, 608, 611-619
 alfa 154, 170-172, 173, 607, 608, 580, 615
 diagnóstico 172
 enfermedad por hemoglobina H 172
 beta 134, 154, 158-170, 580, 594, 608, 612, 615
 aspectos clínicos 163
 diagnóstico de laboratorio 165
 hematológicos 165
 bioquímicos 165
 fisiopatología 161
 terapéutica 169
 clasificación 157
 con deficiencia de hierro 39
 defectos 160-161
 de maduración 160
 de traducción 161
 de transcripción 161
 delta-beta ($\delta\beta$) 173, 612, 615
 genética 157, 164, 171
 síntesis 157
 Tejido linfoide asociado a las mucosas 239-241, 270
 Tetrahidrofolato (THF) 58, 60
 Timo 5, 195, 227, 259, 261, 270
 diferenciación y maduración de los linfocitos 227
 Tinción de hierro en orina o en aspirado gástrico 537
 Tirosina quinasa 320, 367, 406, 422
 Toma de muestra 400, 473, 492
 Toxicidad 371, 569
 Transcobalamina 57, 58
 Transferrina 46, 47, 48, 49-50, 81, 479, 531, 538
 Transfusión 29, 84, 131, 164, 373-383, 438, 440, 445, 446, 447, 600
 crónica 381
 en politraumatizados 379
 en sangrado masivo 379
 masiva 376, 381, 438, 446, 447, 481
 síndrome de transfusión masiva 446
 Translocaciones 262, 266, 267, 269, 271, 272, 273, 274, 276, 281, 397, 398, 402-403, 405, 407, 410, 411, 412, 415, 416, 419, 425
 Transportador de metales divalente (DMT1) (*dct1*) (*Nramp2*) 46, 47, 50, 79
 Trasplante alogénico de células madre 327, 366-368, 372
 Trasplante de células madre hematopoyéticas (CMH) 365-372
 alogénico 366-371
 compatibilidad 368
 complicaciones 370
 tardías 371
 tempranas 371
 determinación del sistema HLA 368-369
 técnicas moleculares 369
 fuente de las células madre hematopoyéticas 370
 genética y biología 368
 métodos serológicos 369
 microlinfocitotoxicidad 369
 selección del donador 369
 autólogo 365
 procedimiento 365
 Trasplante de médula ósea 7, 291, 314
 autólogo 7
 Tricoleucemia o leucemia de células peludas 263, 292-293, 627
 cuadro clínico 292

- hallazgos de laboratorio 292
- inmunofenotipo 292
- tratamiento 293
- Tricoleucemia variante 293
 - cuadro clínico y hematológico 293
- Trombocitemia esencial 4, 301-302, 630
 - clínica 302
 - diagnóstico 302
 - evolución 302
 - laboratorio 302
- Trombocitopenia 63, 67, 71, 73, 228, 230, 290, 291, 313, 362, 381, 406, 437-438, 459, 466
 - esencial 406
- Trombocitos o plaquetas 525
- Trombofilias 427, 457, 463
- Trombopoyesis 355, 528
- Trombosis 146, 230, 300, 432, 449, 450, 453, 457-464, 647
 - arterial 300, 453, 457, 458
 - factores de riesgo 458, 459, 462
 - adquiridos 459, 462
 - hereditarios 459-462
 - tratamiento 463
 - venosa 300, 453, 457, 458, 459, 462, 647

V

Valores de referencia de exámenes hematológicos 475-479, 487, 491, 493, 494, 509, 534, 538, 539, 581

- concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) 477
- eritrocitos 477
- hematocrito 476, 509
- hemoglobina 475-476
- hemoglobina corpuscular media (HCM) 477
- hemograma de Schilling (adultos) 478
- leucocitos 477
- reticulocitos (cómputo relativo) 477
- velocidad de eritrosedimentación (VES) 477
- volumen corpuscular medio (VCM) 477

Vasos sanguíneos 429, 437, 457, 471, 633, 634

- punción 471

Velocidad de sedimentación eritrocítica (VSE) (VSG) 477, 479, 511-516

- fundamento 511
- método de Westergren 513
- método de Wintröbe 513
- metodología de medición 512
- modificación al método de Westergren 514
- potencial zeta 511-512
- valores normales 514
- velocidad de sedimentación corregida 513
- semiología 514

Vejez 218-219

- conteo de leucocitos y diferencial 218
- función linfocítica 218
- niveles de hemoglobina y otros parámetros eritrocitarios 218
- patología hematológica en la vejez 219
- plaquetas y fibrinógeno 219
- respuesta leucocitaria a las infecciones 218

Vía de Embden-Meyerhof 112, 542

Vía de las pentosas fosforadas (shunt de las pentosas) 112-113, 114, 541, 542

Vitamina B₁₂ 40, 57, 58, 59, 61, 62, 63, 68, 74, 219, 221-222, 479

Vitamina K 116, 218, 444-445, 461, 463, 468, 480

- deficiencia 444-445

X

Xerocitosis hereditaria 111

MI VIDA

¿Riqueza, fama, honores?
Eso a mi vida le es indiferente.
Yo solo quiero cultivar mis flores
y regar mi canción, como la fuente.

Tener abierto al campo una ventana
para gozar, bajo la tarde inquieta
o a la naciente luz de la mañana,
la rústica visión de una carreta.
Y en las doradas tardes de verano,
pensar... soñar... en vagabundo vuelo;
de una montaña ante el perfil lejano
y bajo el gesto paternal del cielo.

Así, con la sutil filosofía
de quien nada reclama y nada espera,
y a quien le basta el pan de cada día
y una sola ilusión por compañera.

Si nadie me recuerda ni me nombra,
no me habrá de faltar un goce cierto:
un árbol bueno que me dé su sombra,
y en mi sencilla mano... un libro abierto.

Jorge Sáenz Cordero
Poeta costarricense
1899-1975

